Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Untersuchungen zur Oxydation von Hydrazin und Alkylhydrazinen im biologischen Milieu

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dieter Bouhon
aus Nürnberg

Marburg 1973

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Untersuchungen zur Oxydation von Hydrazin und Alkylhydrazinen im biologischen Milieu

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dieter Bouhon
aus Nürnberg

Marburg 1973

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin

der Universität Marburg am 17.7.1973
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent: Prof. Dr. med. W. Schmid
Correferent: Prof. Dr. med. W. Kunz

Meinen Eltern gewidmet

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis:

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Methodik	4
2.1.	Versuche mit Blut	4
2.1.1.	Gewinnung der Erythrozyten und Herstellung des Hämolysates	4
2.1.2.	Standardansatz	5
2.1.2.1.	Phosphat-Puffer	5
2.1.2.2.	Hydrazinlösungen	6
2.1.3.	Messungen	6
2.1.3.1.	Spektren	6
2.1.3.2.	Kritik des Methämoglobinnachweises	7
2.1.3.3.	Quantitative Bestimmung der Methämoglobinkonzentration	10
2.1.4.	Arbeiten in sauerstoffreiem Medium	10
2.2.	Versuche mit Leberhomogenat	12
2.2.1.	Tiermaterial und Tierhaltung	12
2.2.2.	Entnahme und Aufarbeitung der Leber	12
2.2.3.	Bestimmung der Hi-Bildung in einem in vitro System mit Rattenleberhomogenat	13
2.3.	Chemische Untersuchungen	15
2.3.1.	Aldehydnachweis und -bestimmung	15
2.3.1.1.	Hochvakuumgefrierdestillation	15
2.3.1.2.	Qualitativer Nachweis von Formaldehyd und Acetaldehyd	16
2.3.1.3.	Quantitative Bestimmung von Formaldehyd	17
2.3.2.	Chromatographische Methoden	18
3.	Untersuchungen mit Hämolysat	19
3.1.	Vorversuche	19
3.2.	Hauptversuche	20
3.2.1.	Festlegung der Grenzkonzentration	20
3.2.2.	Versuche in sauerstoffreiem Medium	23
3.2.3.	Hydrazinoxydation mit Oxyhämoglobin-sauerstoff	25
3.2.4.	Oxydation von Hydrazin ohne Hämolysat	26

3.3. Chemische Betrachtung 27

3.3.1. Versuche mit Dichlorphenolindophenol 28

3.4. Kinetik der Methämoglobinbildung 29

3.4.1. Diskussion der Kurven 30

3.4.1.1. Hydrazinsulfat 30

3.4.1.2. Symmetrisches und asymmetrisches Dimethylhydrazin 32

3.4.1.3. Symmetrisches Diäthylhydrazin 38

3.4.1.4. Natulan(R) 38

3.4.1.5. Dimethylnitrosamin 38

3.4.2. Zusammenfassung mit stöchiometrischer Betrachtung 38

3.5. Methämoglobinbildung durch Hydrazine im mikrosomalen System 39

3.5.1. Vorversuche mit Anilin und Hydrazinen 40

3.5.2. Hydrazinsulfat 41

3.5.3. Symmetrisches und asymmetrisches Dimethylhydrazin 42

3.5.4. Symmetrisches Diäthylhydrazin 43

3.5.5. Natulan(R) 44

3.5.6. Dimethylnitrosamin 45

3.5.7. Zusammenfassung 45

3.6. Tierversuche 46

3.6.1. Untersuchung der Wirkung von Hydrazinen an der Ratte 46

3.6.2. Zusammenfassung 47

4. Chemisch-physikalische Untersuchungen 47

4.1. Aldehydbildung 47

4.1.1. Nachweis von Formaldehyd und Acetaldehyd 47

4.1.2. Quantitative Bestimmung von Formaldehyd 48

4.1.3. Nachweis von Formaldehyd mit Dimedon 49

4.2. Chromatographische Analysen 50

4.2.1. Versuche zur dünnschichtchromatographischen Trennung der eingesetzten Hydrazine 51

4.2.2. Chromatographie umgesetzter Hydrazine 51

4.2.2.1. Hydrazinsulfat 53

Seite

4.2.2.2. Symmetrisches Dimethylhydrazin
Asymmetrisches Dimethylhydrazin 53

4.2.2.3. Symmetrisches Diäthylhydrazin 56

4.3. Untersuchungen mit Azoäthan 57

4.3.1. Herstellung von Azoäthan 57

4.3.2. Dünnschichtchromatographie von in Salzsäure umgesetztem Azoäthan 57

4.3.3. Methämoglobinbildung durch in Salzsäure umgesetztes Azoäthan 58

4.3.4. Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Azoäthan 59

5. Diskussion der Ergebnisse 60

6. Zusammenfassung 67

Literaturverzeichnis 69

1. Einleitung

Hydrazin und Methylhydrazine sind gut und unter geeigneten Bedingungen nahezu explosiv vollständig oxydierbar. Aus diesem Grund werden sie u.a. auch als Raketentreibstoff verwendet. Bei der Oxydation von Hydrazin mit Eisen (III), Kobalt (III) oder Mangan (IV) entstehen Stickstoff und Wasser, bei den alkylierten Hydrazinen zudem Kohlenwasserstoffe oder auch deren Oxydationsprodukte (Aldehyde). Aufgrund der leichten Oxydierbarkeit von Hydrazin gelingt die Fehlingsche Probe und die Silberspiegelprobe schon in der Kälte, bei NN-Dialkylhydrazinen nach leichtem Erwärmen.(1).

Neben Stickstoff und Wasser können bei der Oxydation mit Quecksilberoxid noch andere Oxydationsprodukte, wie Azoverbindungen und Tetrazene, entstehen (1). Jüngste Untersuchungen mit elektrochemischer Oxydation von Hydrazinen haben ältere Befunde bestätigt, daß neben Stickstoff und Wasser auch noch Ammoniak in geringer Menge auftritt (2).

Außer in der Technik haben Hydrazinderivate auch ihren festen Platz im Arzneimittelschatz eingenommen, wie z.B. als MAO-Hemmer, Cytostatika und Tuberkulostatika. Im Körper wird aus vielen dieser Substanzen Hydrazin abgespalten (z.B. von Iproniazid(R) Isopropylhydrazin) (3).

Hydrazin und die niedrig alkylierten Produkte wirken als starke Basen aufgrund ihrer hohen Reduktionswirkung und wegen ihrer hohen Lipoid- und Wasserlöslichkeit stark haut- und schleimhautreizend. Sie werden sowohl durch die Haut als auch pulmonal in gleicher Weise aus dem Magen-Darmtrakt sehr gut und rasch resorbiert. Als resorptive akute Vergiftungserscheinungen werden Muskelzittern, Krämpfe, wie auch Schädigung an Niere und Leber beschrieben.(4). Bei hohen Dosen kann sich eine Hypoglycaemie als Folge einer Hemmung der Gluconeogenese einstellen; diese beruht offensichtlich teilweise auf der Wirkung nicht metaboliiserten Hydrazins als Hydrazonbildner, vor allem aber auf der Hemmung pyridoxal-phosphat-abhängiger Enzymsysteme. (5,6).

Hydrazin und alkylierte Hydrazine werden teils unverändert, teils metabolisiert ausgeschieden. Untersuchungen von L.V. Colvin haben gezeigt, daß bei der Gabe von ^{14}C-markiertem Monomethylhydrazin ca. 50 % unverändert ausgeschieden werden; der Rest der Aktivität konnte hauptsächlich in der Leber, weniger in Niere, Blase, Pankreas und Blutserum nachgewiesen werden. Innerhalb 10 - 24 Stunden wurden ca. 30 % als $^{14}CO_2$ abgeatmet; es wurde auch $^{14}CH_4$ in der Atemluft nachgewiesen (3). Als weiterer Metabolit für Hydrazin wurde 1,2 Diacetylhydrazin im Harn nachgewiesen (7).

Neben den akuten Wirkungen sind Hydrazin und vor allem auch Alkylhydrazine im chronischen Tierversuch ausgesprochene Cancerogene; so führt Hydrazin zu Lungenadenom und -carcinom (8), während Dimethylhydrazin Darm- und Lebercarcinome erzeugt.(9).

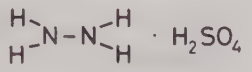
Die bisher berichteten Untersuchungen über den Metabolismus der Hydrazine und deren Alkylderivate haben im Harn und in der Atemluft nur Endprodukte aufgezeigt. Wie aber schon aus dem Erscheinen von $^{14}CO_2$ bzw. $^{14}CH_4$ in der Atemluft hervorgeht, finden intermediär noch andere Abbauvorgänge als Acetylierung statt. Außerdem ist beschrieben, daß bei der Abspaltung von Hydrazin aus INH ein Teil des Hydrazins durch eine Oxydase zu NH_3 metabolisiert wird (10).

Auf die Möglichkeit, daß sogar oxydierende Zwischenprodukte bei der Hydrazinoxydation entstehen können, deuteten eigene Beobachtungen hin, daß bei dem Einwirken von Hydrazin auf Blut in vitro bei neutraler Reaktion nicht, wie vermutet und von Heubner (11) beschrieben, nur reduziertes Hämoglobin auftrat, sondern daß Methämoglobin gebildet wurde. Dieser Befund war der Anlaß, systematische Untersuchungen über solche Intermediärprodukte beim Abbau von Hydrazin und alkylierten Hydrazinen unter Bedingungen des Organismus anzustellen.
Die erste Untersuchungsreihe wurde am Redoxsystem des Hämoglobins in Form von Hämolysat und an Redoxindikatoren durchgeführt.
Da im mikrosomalen System des Leberhomogenates eine N-Hydroxi-

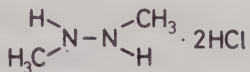
lierung und N-Oxydation mit Anilin gefunden wurde (12), wurden in einer zweiten Reihe Untersuchungen in diesem System gemacht. Zur Erfassung etwaiger Zwischenprodukte wurde hauptsächlich die DC-Analyse herangezogen.

Folgende Hydrazine wurden verwendet (chromatographisch rein):

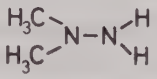
Hydrazinsulfat Mg= 130,1



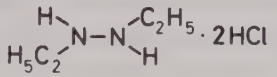
Dimethylhydrazindihydrochlorid (symmetrisches) Mg = 133,0



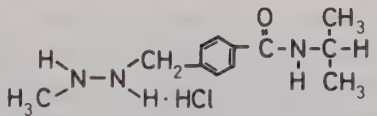
Dimethylhydrazin (asymmetrisches) Mg= 60,1



Diäthylhydrazindihydrochlorid (symmetrisches) Mg=161,1

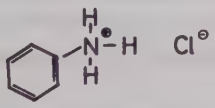


Natulan® (Hydrochlorid) Mg= 257,7

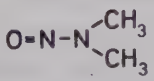


Um die Methämoglobinbildung durch Hydrazine besser beurteilen zu können, wurden folgende Substanzen eingesetzt:

Anilinhydrochlorid Mg=129,6



Dimethylnitrosamin Mg= 74,1



Hydroxylaminhydrochlorid Mg= 69,5

Von ihnen sind Hydroxylaminhydrochlorid und Anilinhydrochlorid als Methämoglobinbildner bekannt, während Dimethylnitrosamin wegen seiner möglichen Reduktion des Hämoglobins als Modellsubstanz eingesetzt wurde.

2. Methodik

2.1. Versuche mit Blut

2.1.1. Gewinnung der Erythrozyten und Herstellung des Hämolysates

Frisches Rinderblut - nach Möglichkeit eines männlichen Tieres - wurde durch Anstechen der Halsvene gewonnen. Durch Schlagen mit einem unten verbreiterten und grob aufgerauhten Glasstab wurde das Blut in 5 - 10 Minuten defibriniert. Das zusammengeklumpte Fibrin wurde durch ein 1 mm Perlonsieb abkoliert.
Das so gewonnene defibrinierte Blut mußte vom Serum befreit werden. Dies geschah durch Zentrifugation in einer Zentrifuge (Fa. Christ) bei 4000 UpM (r = 12 cm) = 2000 g in 30 Minuten. Das überstehende Serum und die auf den Erythrozyten sichtbar liegenden "Leukozytenhaut" wurden mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Erythrozyten mit 0,9 %iger Natriumchloridlösung aufgeschwemmt und nochmals 25 Minuten bei 2000 g abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde solange wiederholt bis der Überstand ungefärbt war: ca. drei- bis viermal. Die so gereinigten Erythrozyten wurden mit 0,9 %iger Natriumchloridlösung auf das Ausgangsvolumen des defibrinierten Blutes aufgefüllt. Diese Erythrozytensuspension wurde als "100 %ige Blutkörperchen" angenommen.

Von dieser Suspension wurde ein 10 %iges Hämolysat durch Verdünnen 1 : 10 mit bidest. Wasser hergestellt. Wurde 100 %-iges Hämolysat gebraucht, so wurde die entsprechende Menge Suspension abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit dest. Wasser auf das alte Volumen aufgefüllt.
Die 100 % Erythrozytensuspension war im Kühlschrank bei + 1° C zwei bis drei Wochen haltbar, ohne nennenswerte Mengen Methämoglobin zu bilden oder Hämolyse zu zeigen.

2.1.2. Standardansatz

Für die Versuche wurde ein Ansatz volumenkonstanter Zusammensetzung angewendet:

Hämolysat	1 Teil
Zu untersuchendes Reagens gelöst in bidest. Wasser	1 Teil
Phosphatpuffer 1 m	1 Teil
bidest. Wasser	7 Teile
	10 Teile

Statt der 7 Teile Wasser konnte auch eine zusätzliche Reagenslösung eingesetzt werden.
Für Vorversuche und orientierende Versuche wurden Zimmertemperatur gewählt, und 5 ml oder 10 ml im Reagensglas angesetzt.

Bei den Kinetikversuchen wurden die Ansätze (meist 100 ml) im Wasserbad unter Luftzutritt bei 37° C im Erlenmegerkolben geschwenkt und so konstante Bedingungen eingehalten.

Die Blindversuche wurden analog angesetzt, nur die Agenslösung durch dest. Wasser ersetzt. Für alle Lösungen und alle Versuche kam doppelt dest. Wasser zur Anwendung.

2.1.2.1. Phosphat-Puffer

Es wurde 1 mol Na_2HPO_4- und 1 mol KH_2PO_4-Lösung in einem Verhältnis gemischt, daß sich bei einer Verdünnung von 1:10 der gewünschte pH einstellte. Der pH wurde zunächst grob mit Merck Indikatorpapier und dann mit der Glaselektrode (pH-Meter Fa. Knick) genau bestimmt.
In den Versuchsreihen wurde normalerweise pH 6,3 und pH 7,2 verwendet.

2.1.2.2. Hydrazinlösungen

Die Hydrazine wurden in molar berechneten Mengen eingesetzt und für jede Versuchsreihe frisch gelöst. Da sie fast alle als Dihydrochloride vorlagen, wurden höhere Konzentrationen als 0,02 m vorher mit ca. 10 %iger Natronlauge auf pH 6 eingestellt. (Die Dihydrochloride der Hydrazine haben in dieser Konzentration ca. pH 2 - 3).

2.1.3. Messungen

2.1.3.1. Spektren:

Die Auswertung der Versuche wurde sowohl qualitativ als auch quantitativ spektrophotometrisch mit dem registrierenden Zeiss Absorptionsspektralphotometer DMR 21 vorgenommen. Hierbei wurde bei der qualitativen Auswertung die zu messende Lösung gegen Wasser gemessen und ein kontinuierliches Absorptionsspektrum geschrieben. Der für die Veränderungen des Hämoglobins durch Hydrazine interessante Spektralbereich liegt zwischen 720 und 460 nm. Die Messungen wurden, soweit nichts anderes angegeben, mit 1 cm Küvetten durchgeführt und dauerten ca. 30 - 40 sec. In Abb. 1 sind die Absorptionsspektren dargestellt, die für die Versuche als Vergleich von Interesse sind.

Zu den Kurven:

Die Kurven wurden bei pH 7,2 aufgenommen (außer Haematin). Oxyhämoglobin und die daraus entstehenden Produkte wurden aus 1 %igem schon gepuffertem Hämolysat hergestellt und wie oben beschrieben gemessen.

a) Oxyhämoglobin (HbO_2)

Die Extinktionsmaxima liegen bei 577 nm und 541 nm, wobei das Maximum bei 577 nm bei frischem HbO_2 deutlich höher ist. Farbe: hellrot.

b) Hämoglobin (Hb)

Es entsteht durch chemischen (z.B. $Na_2S_2O_3$) oder physikalischen Entzug (Vakuum) von Sauerstoff aus HbO_2 und läßt sich schon mit Luftsauerstoff leicht in HbO_2 überführen.
Extinktionsmaximum bei 560 nm.
Farbe: lila.

c) Methämoglobin (Hi)

Es entsteht durch Oxydation des im Hämoglobin zweiwertigen Eisens zu dreiwertigem Eisen z.B. mit Kaliumferrizyanid ($K_3[Fe(CN)_6]$). Es dient nicht mehr als Sauerstoffüberträger. Extinktionsmaxima bei 630 nm und 500 nm.
Farbe: braun.

d) Zyanmethämoglobin (HiCN)

Es entsteht bei Zugabe von Zyanidionen z.B. KCN zu Hi. Es bildet eine dauerhafte Komplexverbindung mit dem dreiwertigen Eisen. Das Extinktionsmaximum liegt bei 534 nm.
Farbe: rubinrot.
Es werden bei der Zugabe von Zyanidionen die Hi-Maxima gelöscht, was für die quantitative Hi-Bestimmung ausgenutzt wird.

e) Hämatin

Es entsteht durch Ansäuern des Blutes auf pH 2,o - 3,o.
Es ist bei diesem pH löslich und fällt bei pH 7,o aus.
Extinktionsmaximum bei 650 nm.
Farbe: braun.

2.1.3.2 Kritik des Methämoglobinnachweises

Um sicherzugehen, daß sich die Methämoglobinbande auch neben der des Oxyhämoglobins mit dem Spektralphotometer gut darstellen und identifizieren läßt, wurde Methämoglobin mit Kaliumferrizyanid gewonnen. Hierbei wurden zu 2 ml

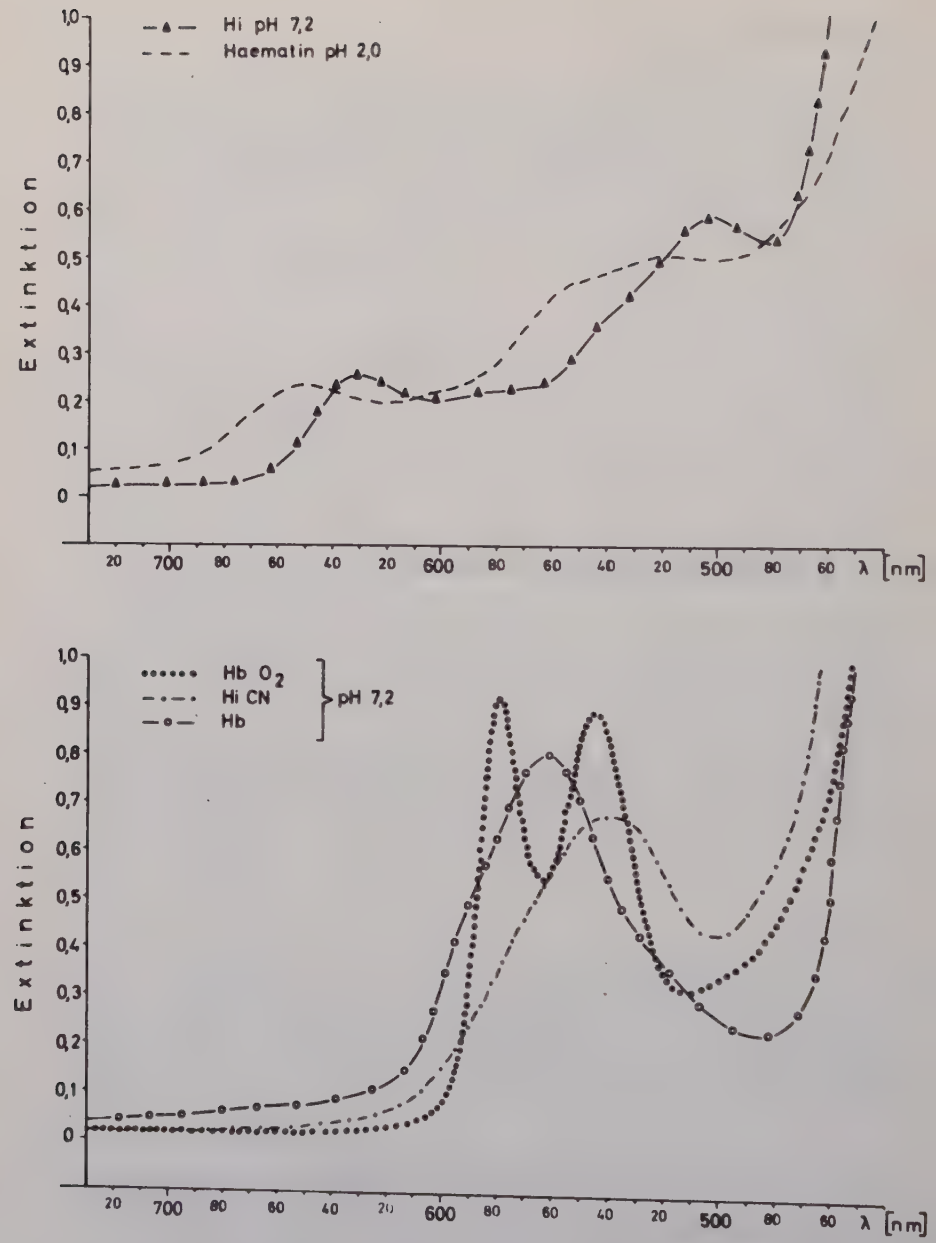


Abb. 1: Absorptionsspektren von Methämoglobin (Hi) und Hämatin, Oxyhämoglobin (HbO_2), Cyanmethämoglobin (HiCN) und reduziertem Hämoglobin (Hb)

eines auf pH 7,2 gepufferten Hämolysates 50 µ l einer 10 %igen Kaliumferrizyanidlösung gegeben. Dabei entstehen 100 % Methämoglobin (Abb. 2, gepunktete Linie). Diese reine Methämoglobinlösung wurde nun mit Hämolysat pH 7,2 versetzt bis hinter der Braunfärbung ein roter Schimmer zu erkennen war. Es wurden nun noch etwa die gleiche Menge Hämolysat aufgefüllt und wieder gemessen (gestrichelte Linie). Nach der nochmaligen Zugabe von Hämolysat war die Lösung fast rein rot mit dunklem Schimmer (gepunktet-gestrichelte Linie).

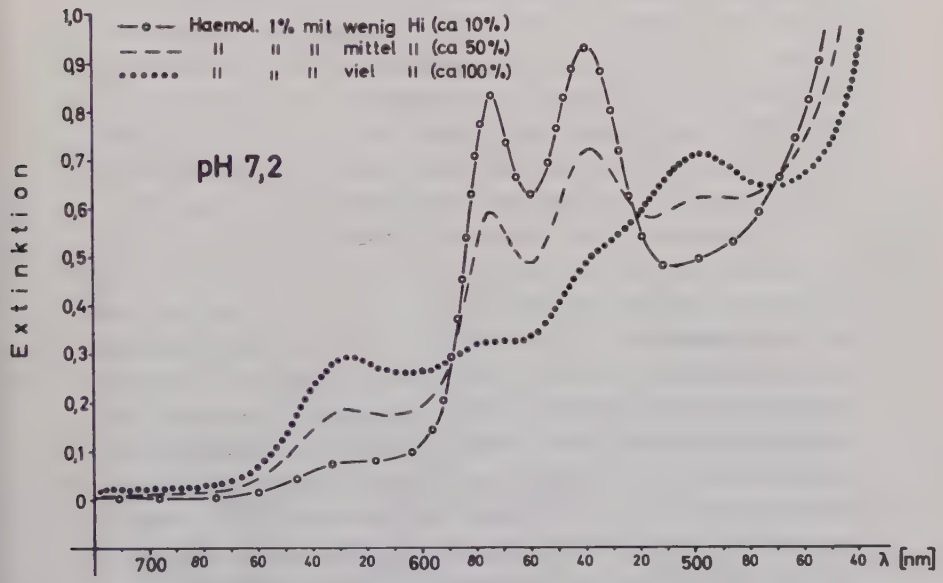


Abb. 2: Methämoglobin - Oxyhämoglobin Mischkurven
Erläuterung siehe Text.

Die charakteristischen Maxima bei 630 und 500 nm für Methämoglobin sind in allen drei Fällen gut und deutlich zu erkennen. Es läßt sich somit im angegebenen pH-Bereich mit dieser Methode ein guter qualitativer Nachweis für Methämoglobin auch neben Oxyhämoglobin führen.

2.1.3.3 Quantitative Bestimmung der Methämoglobinkonzentration

Es wurden, bezogen auf den Oxyhämoglobingehalt, mehrere gleiche Ansätze von 1oo,oo ml nach der Vorschrift des Standardansatzes gemacht, dabei für jeden oben angegebenen pH eine Blindprobe. Die Proben wurden unter Luft bei 37° C im Wasserbad geschwenkt und nach bestimmten Zeitabständen Proben von 1O ml entnommen, die sofort in Eis abgekühlt und unmittelbar gemessen wurden. Nach einer für das vorliegende System modifizierten Zyanidmethode (13,14) wurde mit dem DMR 21 der Methämoglobingehalt bestimmt. Je 2,oo ml des Blutes wurden in eine Meßküvette und eine Vergleichsküvette einpipettiert (2 cm Halbmikroküvetten). Nach Zugabe von o,o2 ml einer 1 %igen Kaliumcyanidlösung in die Meßküvette wurde sofort ein Differenzspektrum von 78O bis 6oo nm geschrieben und so der X %-Wert festgestellt. Die Blindprobe diente zusätzlich noch der Bestimmung des 1OO %-Wertes. Es wurde nach Messen des X %-Wertes in jede Küvette o,o5 ml einer 1O %igen Kaliumferricyanidlösung einpipettiert und so alles Oxyhämoglobin zu Methämoglobin oxydiert. Auf diese Weise konnte der für alle Proben einheitliche Gehalt festgestellt werden. Aus beiden Werten wurde nach Ausmessen der Extinktionsdifferenz bei 63O nm der Anteil des Methämoglobins am Gesamtglobin berechnet (s. auch Abb. 4). Die Messungen wurden bei pH 6,3 und pH 7,2 durchgeführt. Beide pH-Werte zeigten bei gleichem Methämoglobingehalt gleiche Extinktion. Es besteht also in diesem pH-Bereich kein Extinktionsunterschied.

2.1.4 Arbeiten in sauerstoffreiem Medium

Um Versuche in sauerstoffreiem Medium durchführen zu können, wurde eine einfache Vorrichtung entwickelt, die es gestattet, zwei Lösungen nebeneinander von Sauerstoff zu befreien und anschließend zu mischen (Abb. 3). Das nach außen völlig

dichte Glas-System kann von oben durch den Schliffaufsatz mit Hahn evakuiert und von unten durch die beiden Hähne und Fritten mit einem inerten Gas belüftet und die Flüssigkeit durchperlt werden.

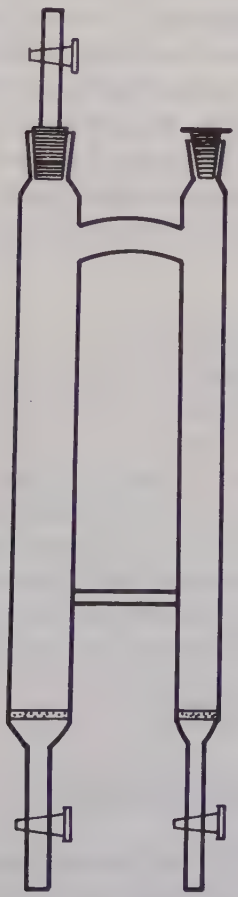


Abb. 3: Glasgefäß zum Entgasen von Lösungen und für Arbeiten in sauerstoffreiem Medium.

Sollte eine Untersuchung in sauerstoffreiem Medium durchgeführt werden, so wurde der Standardansatz in der Weise geteilt, daß die reagierenden Agentien in die getrennten Röhren kamen. Nun wurde am oberen Hahn ein Vakuum angelegt. Die unteren Öffnungen wurden mit einer Heliumgasflasche verbunden. So konnte abwechselnd evakuiert und mit Helium durchgast werden. Nachdem dieser Vorgang ca. 20-mal wiederholt wurde, waren die Lösungen sauerstoffrei (das Hämolysat war lila). Die Flüssigkeiten wurden gemischt, nachdem das Innere mit Helium auf leichten Überdruck gebracht wurde. Durch die unteren Auslässe ist es möglich, unter Luftabschluß in mit wenig Benzol gefüllte Küvetten einzufüllen.

2.2 Versuche mit Leberhomogenat

2.2.1. Tiermaterial und Tierhaltung

Die Tierversuche wurden mit Albinoratten (Stamm Sprague-Dawley, Biberach) durchgeführt. Die Ratten wurden in Vierergruppen in Makrolonkäfigen bei klimatisierten Stallverhältnissen und zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Trinkwasser aus Saugflaschen und Trockenfutter (Altromin) standen ad libitum zur Verfügung. Es wurden nur männliche Tiere verwendet.

2.2.2. Entnahme und Aufarbeitung der Leber

Die Ratte wurde durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Nach völligem Entbluten wurde die Leber sorgfältig freipräpariert und auf einer Präzisionswaage ($\pm$ 5 mg) gewogen. Nach grobem Zerkleinern wurde die Leber in eiskalter 0,25 m Saccharoselösung (1 g/2 ml) mit Hilfe eines Pistill Homogenisators nach Potter-Elvehjem (Teflon Pistill-Glasgefäß) bei etwa 1ooo UpM und 0° C homogenisiert.

Verwendete Lösung:	Saccharose	4,275
	Aq. bidest ad	50 ml

Die homogenisierte Leber wurde durch zweimalige Zentrifugation (5 min bei 1600 g und 20 min bei 9000g) von groben Bestandteilen-Kernen – gereinigt. Der Überstand wurde als gereinigtes Leberhomogenat nach nochmaligem Homogenisieren mit dem Teflon-Homogenisator eingesetzt: Es enthält außer mitochondrialem Material die durch Zertrümmerung des endoplasmatischen Reticulums entstandenen Mikrosomen; in diesem sind Enzyme vorhanden, die u.a. Fremdstoffe metabolisieren. Es interessierten hier vor allem die N-oxydierenden Komponenten (16).

2.2.3 Bestimmung der Hi-Bildung in einem in vitro System mit Rattenleberhomogenat

Die Bestimmung wurde in einem modifizierten System nach Thauer, Stöffler und Ühleke (15) durchgeführt.

Standardansatz:	Leberhomogenat	4,0 ml
	Hämolysat 50 %	2,00 ml
	Tyrode Glucose	2,0 ml
	Hydrazinlösung o. Anilinlösung entspr. Molarität pH 7,2	1,0 ml
	NADP reg. System	1,0 ml
Blindversuch:	Leberhomogenat	4,0 ml
	Hämolysat 50 %	2,00 ml
	Tyrode Glucose	3,0 ml
	NADP reg. System	1,0 ml

Verwendete Lösungen:

Tyrode Glucose

NaCl	8,0 g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,2 g
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,1 g
KCl	0,2 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,947 g
KH_2PO_4	0,181 g
Glucose	3,0 g
Aq. bidest	ad 1000 ml

NADP reg. System:

$MgCl_2$	12,14 mg
Glucose-6-phosphat	13,0 mg
NADP	7,5 mg
Nicotinamid	0,1 mg
Aq. bidest	ad 1 ml

Der Ansatz wurde im Wasserbad unter Luftzutritt bei 37° C geschwenkt und jede 1/2 h eine Probe zur Hi-Bestimmung entnommen. Hierbei wurde 1,oo ml der Lösung mit 9,o ml dest. Wasser verdünnt und die Verdünnung im Kühlhaus bei 9ooo g 20' zentrifugiert. Der Überstand wurde dann, wie schon beschrieben, zur Bestimmung herangezogen.
Als Blindproben dienten der oben angeführte Blindversuch und ein Ansatz mit o,o2 mol Anilin, um das reg. System und die Versuchsanordnung jedesmal neu zu testen. Neben diesen beiden Blindversuchen wurde noch ein Blindversuch ohne reg. System, jedoch mit Hydrazin durchgeführt, um den Unterschied zu den Homogenatwerten festzuhalten. Der 100 %-Wert wurde auch hier, wie schon beschrieben, dem reinen Blindversuch entnommen.
Die Werte wurden wieder durch das Differenzspektrum (Abb.4) aufgenommen.

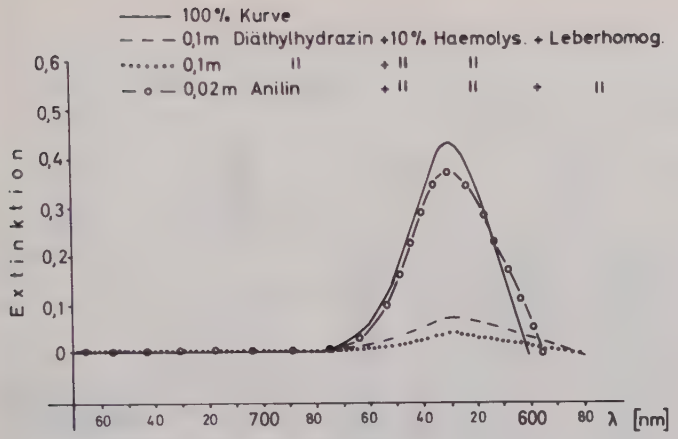


Abb. 4: Differenzspektren zur Bestimmung des Hi-Gehaltes im Hämolysat

Erklärung:

Berechnung für z.B. o,o2 m Anilin (die Extinktion wurde mit 1oo multipliziert)

100 % = 43,5
X % = 37,0

$$X = \frac{37.1oo}{43,5}$$

X = 85,0 %

2.3. Chemische Untersuchungen

2.3.1. Aldehydnachweis und -bestimmung

2.3.1.1. Hochvakuumgefrierdestillation

Um flüchtige Bestandteile wie Aldehyde bei der Zersetzung der Hydrazine zu erfassen, wurde ein der Gefriertrockung ähnliches Verfahren angewandt. Es wurde aus einem Kolben im Hochvakuum über eine Spritzfalle in zwei mit flüssigem Stickstoff gekühlte Vorlagen destilliert (Abb. 5). Auf diese Weise erzielt man eine sehr schonende Destillation und vermeidet eine Zersetzung, die durch Erwärmung auftreten könnte.

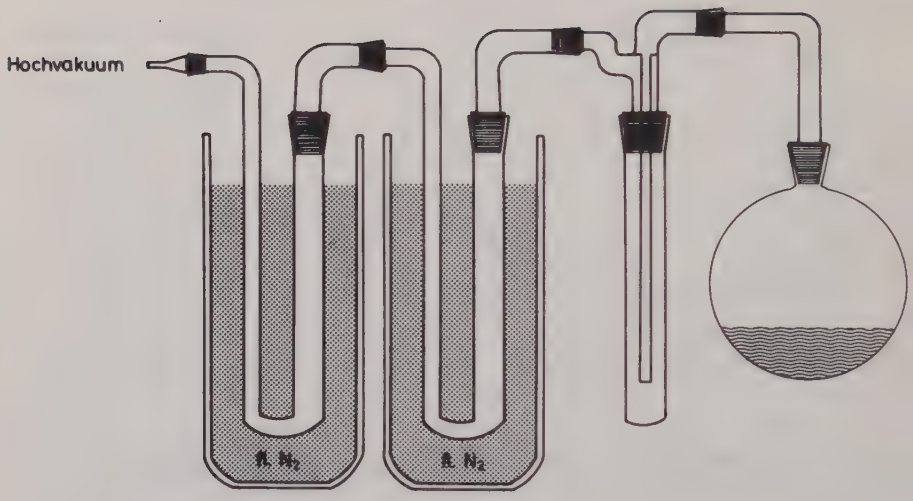


Abb. 5: Hochvakuumdestillationsapparatur zur schonenden Destillation flüchtiger Bestandteile. (Erläuterung siehe Text)

Die zu untersuchende Flüssigkeit wurde vorsichtig mit Salzsäure (35 %ig pA) auf pH 3 eingestellt, um zu verhindern, daß auch Hydrazine mit übergehen, die so als Salz zurückbleiben. Das in den Vorlagen aufgefangene Material wurde aufgetaut und qualitativ oder quantitativ untersucht.

2.3.1.2. Qualitativer Nachweis von Formaldehyd und Acetaldehyd

Zum Nachweis von Formaldehyd wurde die Vorschrift des DAB 7 herangezogen und leicht modifiziert.

Lösungen: 5 % Chromotropsäurelösung
Schwefelsäure pA 98 %

In ein Reagensglas wurden o,5 ml frisch bereitete Chromotropsäurelösung gegeben, dann 1 ml Schwefelsäure. Nach dem

Mischen wurde 1 ml der zu prüfenden wässrigen Lösung zugegeben und dann mit Schwefelsäure unterschichtet. Es bildete sich bei Anwesenheit geringster Spuren Formaldehyd ein violetter Ring.
Grenzkonzentration: $5 \cdot 10^{-6}$ molare Formaldehydlösung.

Zum Nachweis von Acetaldehyd wurde die Probe nach Simon (16) angewandt.
Lösungen: 4 % Nitroprussidnatriumlösung
Piperidin.

Zu der auf Acetaldehyd zu untersuchenden Probe wird ein Tropfen Nitroprussidnatriumlösung und nach dem Umschütteln ein Tropfen Piperidin hinzugefügt. Nach dem Umschütteln ergibt sich eine Blaufärbung.
Grenzkonzentration: $5 \cdot 10^{-5}$ molare Acetaldehydlösung.

2.3.1.3. Quantitative Bestimmung von Formaldehyd

Die Formaldehydbestimmung wurde nach D.A. MacFadyen durchgeführt (17).
Es wurde dabei so vorgegangen, daß jeweils 10,00 ml eines größeren Standardansatzes genommen und mit 1,0 ml 35 %iger Salzsäure pA angesäuert wurden. Diese Lösung wurde bis zur Trockne überdestilliert. Das Destillat wurde aufgetaut und in ein 25 ml Meßkölbchen gespült (mit konz. Schwefelsäure p.a.). Das Gemisch wird mit 2 ml 5 %iger Chromotropsäurelösung versetzt, mit Schwefelsäure bis zum Eichstrich vorsichtig aufgefüllt und nach dem Umschütteln 1/2 Stunde in das siedende Wasserbad gesetzt.
Nach dem Abkühlen wird die, je nach Formaldehydgehalt mehr oder weniger stark violett gefärbte Lösung, gegen einen analog behandelten Blindwert bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen. An einer vorher aufgenommenen Eichkurve mit bekannter Formaldehydmenge kann man dann den Gehalt ablesen.

Die günstigste Formaldehydkonzentration für diese Messung liegt bei 1 cm Küvetten zwischen 10^{-4} und 10^{-5} Mol.

2.3.2. Chromatographische Methoden

Um Abbau- und Umsetzungsprodukte der Hydrazine zu erfassen, wurde mit dünnschichtchromatographischen und präparativ chromatographischen Methoden gearbeitet.

Fließmittel:	I	Chloroform	90 ml
		Methanol	5 ml
		Diäthylamin	5 ml
	II	Chloroform	95 ml
		Methanol	5 ml

Als Sorptionsmittel diente zur DC Kieselgel GF, das in 250 µ starker Schicht auf 20 x 20 cm Platten aufgetragen wurde.(18)

Zur präparativen Chromatographie wurde Kieselgel P und PF verwendet (in den üblichen Anschüttelungen), das in 2 mm starker Schicht auf 20 x 20 cm Platten aufgetragen wurde. Die Platten wurden 1 bzw. 3 Stunden bei 120° C aktiviert und dann im Exsiccator über Trockengel aufgehoben.
Die Fließkammern waren voll dampfgesättigt.
Entwickelt wurden die Platten nach verschiedenen Methoden, die im einzelnen bei den Versuchen noch beschrieben werden.
Die Startflecke wurden in 1 cm langen schmalen Strichen mit einer Spezialpipette aufgetragen. Bei den präparativen Platten wurden die Substanzlösungen bandförmig aufgesprüht.

3. Untersuchungen mit Hämolysat

3.1. Vorversuche

In den Vorversuchen mit Hydrazinsulfat wurde als Stammlösung für jeden Versuch eine 0,4 m Hydrazinsulfatlösung hergestellt. Von dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe durch Verdünnen mit dem gleichen Volumen gewonnen. So standen Verdünnungen von o,4, o,2, o,1, o,o5, o,o25 und o,o175 m zur Verfügung. Die Versuche erstreckten sich zunächst auf verschiedene pH des Standardansatzes und deren Auswirkung auf die Hämoglobinveränderung. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse nach dreistündigem Stehen bei rein visueller Beobachtung zusammengefaßt.

mol. Endkonz. an Hydrazinsulf. / pH	0,04	0,02	0,01	0,005	0,0025	0,00175	Kontrolle
5,0	braun +++++	braun ++++	braun ++	braunrot +	etw. dunkl. als K. +	wie K +	rot +
6,0	braun +++++	braun +++	braun +	rotbraun +	etwas dunkl. als K. +	wie K +	rot +
6,5	braun ++++	braun ++	braun +	rotbraun +	fast wie Kontr. +	wie K +	rot +
7,0	braun +++	braun ++	braun-rot +	rotbraun +	fast wie Kontr. +	fast wie Kontr. +	rot +
7,5	braun ++	braun +	braun-rot +	dunkl. Rot als Kontr. +	wie K +	wie K +	rot +
8,0	braun ++	braun +	braun-rot +	dunkl. Rot als K. +	wie K +	wie K +	rot +

Tabelle 1: Beobachtung der farblichen Veränderung von 1 %igem Hämolysat nach bestimmten Zeiten bei fallenden Hydrazinsulfatkonzentrationen. Erläuterung S.20

Erläuterung zur Tabelle 1:

+++++ Farbe nach 15 Minuten
++++ Farbe nach ca. 30 Minuten
+++ Farbe nach ca. 1 Stunde
++ Farbe nach ca. 2 Stunden
+ Farbe nach ca. 3 Stunden

Es ließ sich also eine mehr oder weniger schnell eintretende und intensive Braunfärbung feststellen. Die sauren pH wurden dabei schneller braun als die alkalischen. Deutlich zu beobachten war dies bei den Konzentrationen o,o2 und o,o1 m. Da eine rein visuelle Methode nicht ausreichte, um die Veränderungen (Braunfärbung) als Methämoglobin oder Hämatin zu charakterisieren, wurden von jedem Versuch Spektren geschrieben, die die Braunfärbung deutlich als Methämoglobin auswiesen. Hierbei mußten jedoch alkalischere pH als 7,5 ausgeklammert werden, da sich, wie bekannt, bei stärker alkalischem pH das Maximum des Methämoglobins verschiebt (Maxima bei: 576 und 540 nm bei pH 9,2). Daher wurde bei allen folgenden Versuchen ein pH zwischen 6,o und 7,5 gewählt; meist 6,3 und 7,2.

3.2. Hauptversuche

3.2.1. Festlegung der Grenzkonzentration

Um den zeitlichen Verlauf der Methämoglobinbildung festzuhalten, wurde ein Standardansatz mit o,o4 m Hydrazinsulfat Endkonzentration und einem pH 7,o ca. in 1/2 bis 1 Stunden Abständen gemessen (Abb. 6).

Nachdem sich am Spektrum nach 1/2 Stunde noch nicht viel geändert hatte, wurde nach 1 h 20' nochmals gemessen. Neben einer Methämoglobinbildung ist der Anteil an Oxyhämoglobin stark zurückgegangen, kenntlich an der starken Abnahme der Extinktionsmaxima bei 577 und 541 nm gegenüber der Kontrolle (vgl. Abb. 1).

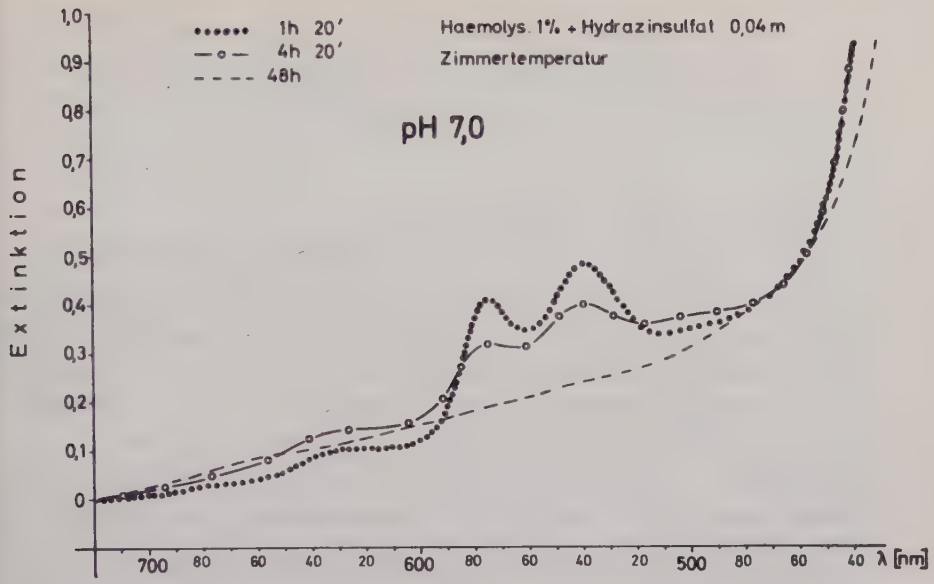


Abb. 6: Absorptionsspektren der Umsetzung von 1 % Hämolysat enthaltend o,o4 m Hydrazinsulfat; geschrieben nach angegebenen Zeitabständen.

Die hohe Hydrazinkonzentration hat offensichtlich schon einen gewissen Anteil an Oxyhämoglobin zerstört. Nach weiteren 3 Stunden sind die Methämoglobinpeaks gegenüber der Grundlinie nicht mehr wesentlich erhöht, jedoch sind auch die Peaks für Oxyhämoglobin nochmals stark zurückgegangen. Auf der nach 48 Stunden aufgenommenen Kurve ist jeder charakteristische Peak verschwunden. Die Lösung war nach dieser Zeit schmutzig braungrün.

Aus diesen Versuchen ergab sibh, daß zunächst systematisch bei bestimmten pH die Grenzkonzentration nach oben und unten für alle zum Einsatz kommenden Hydrazine ermittelt werden mußten, da hier klar zum Ausdruck kommt, daß eine zu hohe Hydrazinkonzentration zu viele Nebenreaktionen ablaufen läßt. Gleichzeitig war die Forderung zu stellen, daß die obere Grenzkonzentration bei allen Hydrazinen eine deutliche Methämoglobinbildung innerhalb maximal 5 Std. zeigen sollte.

Wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich, erfüllte dies für alle Hydrazine die 0,02 m Konzentration.

Deutliche Methämoglobinbildung nach:

Konzentration	0,04 m	0,02 m	0,01 m	0,005 m	0,0025m	0,00125m
Hydrazinsulfat	15 min	30 min	1 h	5 h	8 h	15 h
symmetrisches Dimethyl-hydrazin	ca 1 h	ca 2 h	5 h	10 h	15 h	--
asymmetrisches Dimethyl-hydrazin	ca 2 h	ca 3 h	7 h	11 h	15 h	--
Diäthyl-hydrazin	4 h	ca 5 h	15 h	--	--	--

Tabelle 2:
Zeitliche Bestimmung der sinnvollen maximalen und unteren Grenzkonzentration, die zur Methämoglobinbildung führt.

Bei dieser Versuchsreihe zeigte sich, daß die substituierten Hydrazine mit zunehmender Kettenlänge träger reagieren. Man erhält mit symmetrischem Dimethylhydrazin wesentlich schneller Methämoglobin als mit symmetrischem Diäthylhydrazin. Ebenso nimmt auch die hämoglobinzerstörende Wirkung in dieser Richtung ab.
Die unteren Grenzkonzentrationen wurden nach 15-stündiger Einwirkzeit festgestellt. Es ergaben sich für den pH-Bereich 6,3 bis 7,2 folgende Werte:

Hydrazinsulfat: o,oo125 m
Symmetr. und asymmetr. Dimethylhydrazin: o,oo25 m
Symmetr. Diäthylhydrazin: o,o1 m

Im Verlauf der Versuche zeigte sich, daß die Hydrazine sehr gut und klar ohne zu starke Hämoglobinzerstörung Methämoglobin bilden, wenn man sie in der doppelten Konzentration der unteren Grenzkonzentration einsetzt. Hierbei ist die optimale

Methämoglobinbildung erst nach einer Einwirkzeit von 10-15 Stunden bei Zimmertemperatur zu erreichen. Dabei bilden die Kontrollen ohne Hydrazine nur geringfügig bis kein Methämoglobin.

3.2.2. Versuche in sauerstoffreiem Medium

Um die Frage zu klären, ob zur Oxydation von Hämoglobin mit Hydrazinen Sauerstoff erforderlich ist, wurden Versuche in sauerstoffreiem Medium durchgeführt. In die beschriebene Apparatur (Abb. 3) wurde ein geteilter Standardansatz von 10 ml eingebracht. Eine Kammer enthielt Hämolysat und die andere Kammer schon auf pH 7,2 gepuffertes symmetrisches Dimethylhydrazin für eine gesamte Endkonzentration von o,oo5 m. Nach dem Entgasen und Befreien von Sauerstoff wurde gemischt und dieses Gemisch 15 Stunden unter Luftabschluß stehen gelassen. Ein entsprechender Standardansatz mit o,oo5 m symmetrischem Dimethylhydrazin wurde an der Luft unter gleichen Bedingungen stehen gelassen.

Von beiden Proben wurde nach der angegebenen Zeit ein Spektrum geschrieben. Die sauerstoffreie Probe zeigte bei sowohl sauerstoffreier Messung als auch nach dem Durchperlen mit Sauerstoff keine Methämoglobinbildung. Die unter normalen Bedingungen angesetzte Probe hatte bereits eine relativ große Menge (ca. 40 %) Methämoglobin gebildet.
Durch weitere Proben bei gleichem pH in sauerstoffreiem Medium mit zwei Methämoglobinbildnern wurde auch ohne Anwesenheit von Sauerstoff Methämoglobin gebildet. Es wurde der geteilte Standardansatz wie oben beschrieben, statt mit Hydrazin mit o,o5 m Kaliumferrizyanid bzw. o,o5 m Hydroxylamin Endkonzentration versetzt. Die Proben wurden von Sauerstoff befreit und gemischt. Bei beiden Versuchen bildete sich spontan Methämoglobin in sauerstoffreiem Medium, was durch Messung unter Sauerstoffabschluß und nach Sauerstoffzutritt nachgewiesen wurde (Tab. 3).
Um mit Hydrazinen Oxyhämoglobin zu Methämoglobin zu oxydieren, ist also Sauerstoff nötig. Das Hydrazin muß zunächst unter Sauerstoffverbrauch oxydiert werden, um ein Produkt zu bilden, das seinerseits Oxyhämoglobin zu Methämoglobin oxydiert.

	Extinktionsmaximum bei					
	630 nm	577 nm	560 nm	541 nm	500 nm	ca.Hi %
o,oo5 m sym. Dimethylhydrazin ohne Sauerstoff gestanden u. gemessen	--	--	1,0	--	--	0
nach dem Durchperlen mit Luft	--	1,10	--	1,12	--	0
o,oo5 m sym. Dimethylhydrazin an Luft gestanden	0,15	0,90	--	0,95	0,65	40 %
0,05 m $K_3[Fe(CN)_6]$ ohne Sauerstoff	0,39	--	--	--	0,95	100 %
nach dem Durchperlen mit Luft	0,39	--	--	--	0,95	100 %
0,05 m NH_2OH ohne Sauerstoff	0,28	--	--	--	0,62	100 %
nach dem Durchperlen mit Luft	0,28	--	--	--	0,62	100 %

Tabelle 3:

Extinktionsmaxima von 1 % Hämolysat nach Behandlung mit symmetrischem Dimethylhydrazin unter Luftabschluß (red. Hämoglobin) und mit Luftzutritt (Oxyhämoglobin) im Vergleich zu Methämoglobinbildnern. Die Ansätze mit $K_3[Fe(CN)_6]$ und NH_2OH enthielten unterschiedliche Hämoglobinmengen.

3.2.3. Hydrazinoxydation mit Oxyhämoglobinsauerstoff

Zum weiteren Nachweis des Sauerstoffverbrauches des Hydrazinabbaues, der zur Methämoglobinbildung führt, wurde folgender Ansatz gemacht: Standardansatz pH 7,2 mit o,o2 m symmetrischem Dimethylhydrazin, jedoch noch ohne Zugabe von 1 ml 10 %igem Hämolysat. Die 9 ml wurden nun von Sauerstoff befreit und bei leichtem Unterdruck gehalten. Darau wurde 1 ml 10 %iges Hämolysat so eingesaugt, daß dabei gleichzeitig kein Sauerstoff zutreten konnte. Nachdem dann ein leichter Helium-Überdruck hergestellt war, wurde die Mischung im Wasserbad bei 37° C drei Stunden geschwenkt. Danach wurde ein Spektrum bei Luftabschluß geschrieben. Neben einer mäßigen Methämoglobinbildung (ca. 15-20 %) war gleichzeitig festzustellen, daß die charakteristischen Peaks für Oxyhämoglobin dem für Hämoglobin gewichen waren. Nach kurzem Durchgasen der Lösung mit Sauerstoff war der Peak für Hämoglobin verschwunden und die beiden Peaks für Oxyhämoglobin wieder da. Auch visuell war dieser Vorgang gut zu beobachten.
Während die Lösung am Anfang des Versuches noch rot war, zeigte sie nach den drei Stunden im Wasserbad eine lila Farbe mit braunem Unterton. Nach Luftzutritt war dann die übliche rote Farbe mit braunem Unterton zu erkennen. In diesem Versuch wurde also gezeigt, daß Hydrazin den zu seiner Oxydation notwendigen Sauerstoff auch oder hauptsächlich dem Oxyhämoglobin entzieht.

	Extinktionsmaximum bei					
	630 nm	577 nm	560 nm	541 nm	500 nm	ca. Hi%
o,o2 ms Dimethylhydrazin mit HbO_2 unter Helium geschüttelt und unter Luftabschluß gemessen	o,o8	---	o,98	---	o,60	15-20
nach Durchperlen mit Sauerstoff	o,o8	1,o9	---	1,12	o,60	15-20

Tabelle 4: Extinktionsmaxima von 1 % Hämolysat (Oxyhämoglobin) nach Behandlung mit o,o2 m Hydrazin bei Luftabschluß.

3.2.4. Oxydation von Hydrazin ohne Hämolysat

Um festzustellen, ob Hämolysat auf die Oxydation von Hydrazinen einen Einfluß hat, wurden drei Standardansätze bereitet:

1) 100 ml Ansatz mit o,o2 m Hydrazinsulfat
2) 100 ml Ansatz als Blindprobe ohne Hydrazinsulfat
3) Die Menge für einen 1oo ml Ansatz an Hydrazinsulfat und Puffer in 90 ml ohne Blut.

Ansatz 1 und 3 wurden jeweils noch mit symmetr. und asymmetrischem Dimethylhydrazin gemacht. Alle Ansätze waren auf pH 7,2 eingestellt. Sie wurden unter Luft bei 37° C im Wasserbad geschwenkt und alle halbe Stunde eine Probe entnommen und die Menge gebildetes Methämoglobin gemessen. Von Ansatz 3 wurden jeweils 9 ml entnommen und erst unmittelbar vor der Messung 1,oo ml 10 %iges Hämolysat zugesetzt. Diese Mischung wurde vor dem Messen noch ca. 3 bis 4 Minuten stehengelassen. (Tabelle 5).

Ergebnisse:

% Methämoglobin nach h:		1/2	1	1 1/2	2
Hydrazin-sulfat	mit Blut geschüttelt	12,5	5,O	--	--
	ohne Blut geschüttelt	o,8	3,7	4,2	5,O
Symmetrisches Dimethyl-hydrazin	mit Blut geschüttelt	14,2	22,5	24,3	25,o
	ohne Blut geschüttelt	o,o	6,7	7,5	5,o
Asymmetr. Dimethyl-hydrazin	mit Blut geschüttelt	o,8	3,3	5,8	7,5
	ohne Blut geschüttelt	o,o	1,o	1,7	2,o
Kontrolle		o,8	1,7	2,o	2,5

Tabelle 5: Einfluß des Oxyhämoglobinsauerstoffes auf die methämoglobinbildende Wirkung einiger Hydrazine.

Das zum Schluß zugesetzte Hämolysat war methämoglobinfrei; die Kontrolle bezieht sich also nur auf die mit Hämolysat geschüttelten Proben.
Aus diesen Daten läßt sich ablesen:
1) Es bildet sich unter Luftzutritt bei 37°C ein oxydierendes Produkt.
2) Oxyhämoglobin beschleunigt die Bildung dieses Produktes.

3.3. Chemische Betrachtung

Aus den vorangegangenen Versuchen läßt sich ableiten, daß die Hydrazine durch den Sauerstoff des Oxyhämoglobins beschleunigt oxydiert werden. Dabei entstehen Produkte, die ihrerseits Hämoglobin zu Methämoglobin oxydieren. In einem Formelschema ließe sich das wie folgt veranschaulichen:

$$x\ HbO_2 + y\ \text{Hydrazin} \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow x\,Hb + y\ \text{oxidiertes Produkt}$$
$$Hb + \text{oxid. Produkt} \longrightarrow Hi + \text{reduziertes Produkt}$$

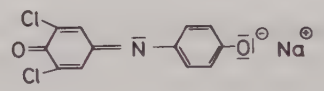
Hier ist berücksichtigt, daß ein das Hämoglobin oxydierendes Produkt auch über mehrere Schritte gebildet werden kann (durch mehrere Pfeile angedeutet).

Es war die Frage zu prüfen, ob an der Katalyse des Hämolysates bei der Hydrazinoxydation Fermente beteiligt sind, wie sie von Heubner für die Umsetzung des Anilins nachgewiesen wurden. Aus diesem Grund wurden im hämolysatfreien Ansatz einige Redoxindikatoren geprüft, deren Potential in der Nähe des Oxyhämoglobins liegt.
Aus Vorversuchen zeigte sich, daß weder Methylenblau noch Triphenyltetrazoniumchlorid ausreichend schnell reduziert wurden. Dagegen wurde Dichlorphenolindophenol von den eingesetzten Hydrazinen entsprechend ihrer Reaktionsschnelligkeit entfärbt (= reduziert). In allen Fällen wurden die Redoxindikatoren in gleicher Konzentration und bei gleichem pH

eingesetzt.(Methylenblau wurde auch nach 20-stündigem Stehen nicht entfärbt. Triphenyltetrazoniumchlorid zeigte nach 24-stündigem Stehen rötliche Färbung.)

3.3.1. Versuche mit Dichlorphenolindophenol

Dichlorphenolindophenol-Natrium Mg= 290,1



In einem Blindversuch mit 1 ml 10^{-3} m Dichlorphenolindophenollösung in gepuffertem Standardansatz ohne Hydrazin wurde auch nach 5-stündigem Stehen keine Methämoglobinbildung beobachtet. Gemessen wurde hierbei gegen einen entsprechenden Ansatz mit 1 ml 10^{-3} m Dichlorphenolindophenollösung in 9 ml Puffer.
Bei tropfenweiser Zugabe einer wässrigen 10^{-3} m Dichlorphenolindophenollösung (Natriumsalz) zu 5 ml o,o2 m wässriger und auf pH 7,2 gepufferter Hydrazinlösung wird Dichlorphenolindophenol schnell entfärbt. Hydrazin reagiert beinahe spontan, symmetrisches und asymmetrisches Dimethylhydrazin benötigen ca. 1 - 2 Minuten zur Entfärbung von 5 Tropfen. Symmetrisches Diäthylhydrazin benötigt für die gleiche Menge ca. 3 - 4 Min. Bei Natulan dauert es etwa 2 - 3 Minuten bis die blaue Farbe verschwunden ist.
Alle Hydrazinlösungen, die mit Dichlorphenolindophenol oxydiert wurden, bildeten nach Zugabe von Hämolysat spontan Methämoglobin, wobei auch hier Hydrazin schneller reagierte als die methylierten und diese schneller als das äthylierte Hydrazin. (Zeiten siehe oben).

Ebenso verhält es sich, wenn man eine 10^{-3} m Dichlorphenolindophenollösung in einen z.B. o,o2 m Hydrazin enthaltenden Standardansatz tropft. Es verschwindet die Farbe des Dichlorphenolindophenols und in der gleichen Schnelligkeit erscheint die Farbe des Methämoglobins. Diese Versuche wurden mehrmals mit unterschiedlichen Hydrazinkonzentrationen wiederholt.

wobei man immer wieder die gleichen Ergebnisse erzielt: eine spontane Methämoglobinbildung durch Hydrazine, die mit Dichlorphenolindophenol oxydiert wurden.

Aus dieser Versuchsreihe kann man schließen, daß die im Hämolysat vorhandenen Enzyme für die Bildung des oxydierenden Produktes keine wesentliche Rolle spielen.

3.4. Kinetik der Methämoglobinbildung

In den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, daß alle eingesetzten Hydrazine eine mehr oder weniger starke methämoglobinbildende Wirkung aufweisen. Auch stand fest, daß substituierte Hydrazine mit wachsender beidseitiger (symmetrischer) Kettenlänge eine schwächere Wirkung zeigten.

Zur Objektivierung dieser Beobachtungen wurden Kinetikversuche bei 37° C und pH 7,2 bzw. 6,3 angestellt. Bei der Aufnahme der Kurven, in mehreren Meßreihen ermittelt, wurde die Methämoglobinkonzentration, wie eingangs beschrieben, gemessen. Für alle Hydrazine wurde gleiche molare Konzentration gewählt, um vergleichbare Werte zu erhalten. Die Kurven wurden nicht alle mit Hämoglobin aus einer, sondern aus mehreren Chargen aufgenommen. Dabei ergaben sich gewisse geringe Abweichungen; sie erstreckten sich lediglich auf die Menge des gebildeten Methämoglobins, nicht aber auf den prinzipiellen Verlauf der Kurven. In der prozentualen Menge kamen Abweichungen bis ca. $\pm$ 10 % Methämoglobin zwischen einzelnen Messungen bei gleichen Zeiten vor.
Das durch die Hydrazine gebildete Methämoglobin wurde, wie beschrieben, einheitlich auf die Ausgangskonzentration des eingesetzten Oxyhämoglobins bezogen (= 100 %). Dies war deshalb notwendig, weil die Hydrazine das Oxyhämoglobin selbst mehr oder weniger schnell zerstörten. Das wurde bei vorangegangenen Vorversuchen bei Zimmertemperatur festgestellt. In einem 0,01 m symmetrischen Dimethylhydrazin enthaltenden Standardansatz pH 6,3 wurde anschließend an die Methämoglobinbestimmung der Gesamthämoglobingehalt durch

Zugabe von Kaliumferrizyanid als Methämoglobin gemessen. Dabei nahm der Gesamthämoglobinwert gegenüber dem Ausgangswert, wie folgende Tabelle 6 zeigt, ständig ab.

Zeit in h	0	1	2	3	4	5	6
Gesamt-hämoglobin	1oo %	92%	87%	82%	79%	76%	74%

Tabelle 6: Abnahme des Gesamthämoglobingehaltes durch Einwirkung von o,o1 m symmetrischem Dimethylhydrazin in 1 % Hämolysat pH 6,3.

Bei den nun folgenden Kurven wurde die Menge der im Kontrollversuch ohne Hydrazin gebildeten Methämoglobinkonzentration von dem durch die Hydrazine insgesamt gemessenen Methämoglobinwert abgezogen. Dadurch werden die Kurven für beide eingesetzten pH besser und leichter vergleichbar, wie aus Abb. 8 und 9 deutlich hervorgeht.
Nach einer gewissen Zeit bildeten sich fädige Trübungen, die abfiltriert wurden. Die Messung wurde abgebrochen, wenn bei den hohen Hydrazinkonzentrationen die maximale Methämoglobinkonzentration überschritten war.

3.4.1. Diskussion der Kurven

3.4.1.1. Hydrazinsulfat (Abb.7)

Der aus den vorangegangenen qualitativen Meßreihen erwartete rasche Anstieg der Methämoglobinkonzentration ist bei pH 6,3 auch tatsächlich eingetreten. Daß hier o,o2 m Hydrazin im Maximum weniger Methämoglobin als o,oo5 m bildet, läßt sich mit der oben beschriebenen schnellen Hämoglobinzerstörung erklären.

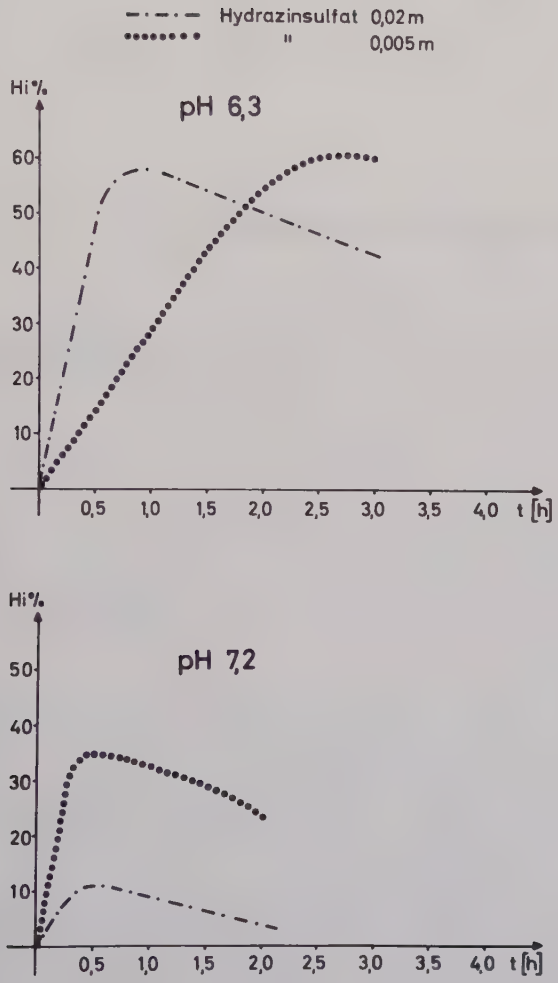


Abb. 7: Kinetik der Methämoglobinbildung von 1 % Hämolysat mit Hydrazinsulfat bei 37° C.

Aus dem Rückgang der Methämoglobinkonzentration geht außerdem hervor, daß auch Methämoglobin selbst durch Hydrazin zerstört wurde. Bei pH 7,2 tritt dieser eben erwähnte Effekt der Hämoglobinzerstörung offenbar noch schneller auf als die ohnehin schon sehr steil ansteigende Methämoglobinbildung. Meßwerte im Abstand von 10 Min. in der ersten halben Stunde fielen in den bei größeren Zeitabständen erhaltenen Kurvenverlauf.

3.4.1.2. Symmetrisches und asymmetrisches Dimethylhydrazin (Abb. 8 und 9)

Auch bei symmetrischem und asymmetrischem Dimethylhydrazin zeigt sich wieder die gleiche hämoglobin- und methämoglobinzerstörende Wirkung. Bei beiden ist bei den hohen Konzentrationen, wenn auch nicht nach so schneller und stürmischer Methämoglobinbildung, ein Abknicken der Kurve zu erkennen, was mit einer Methämoglobinzerstörung erklärt werden kann. Bei den Grenzkonzentrationen (o,oo5 m) zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Während bei pH 6,3 beide Hydrazine nach langsamem Anstieg innerhalb 5 h nur wenig Methämoglobin (15-20 %) bildeten, ist bei pH 7,2 das symmetrische eindeutig schneller wirksam.
Insgesamt ist in den Verlaufskurven zwischen symmetrischem und asymmetrischem Dimethylhydrazin der Anlauf der Reaktion verschieden. So ist sie beim symmetrischen praktisch geradlinig, was einem sofortigen Anlauf der Reaktion entspricht. Das asymmetrische dagegen hat eine verminderte Anlaufzeit, die langsam schneller wird und dann eine gewisse Zeit geradlinig verläuft. (o,o2 m) Gleichzeitig ist jedoch beim symmetrischen Dimethylhydrazin die hämoglobin- und methämoglobinzerstörende Wirkung noch größer, was man bei der o,o2 m Konzentration ablesen kann. Auf Grund der langsameren Methämoglobinzerstörung ist auch der Maximalwert beim asymmetrischen Dimethylhydrazin höher.

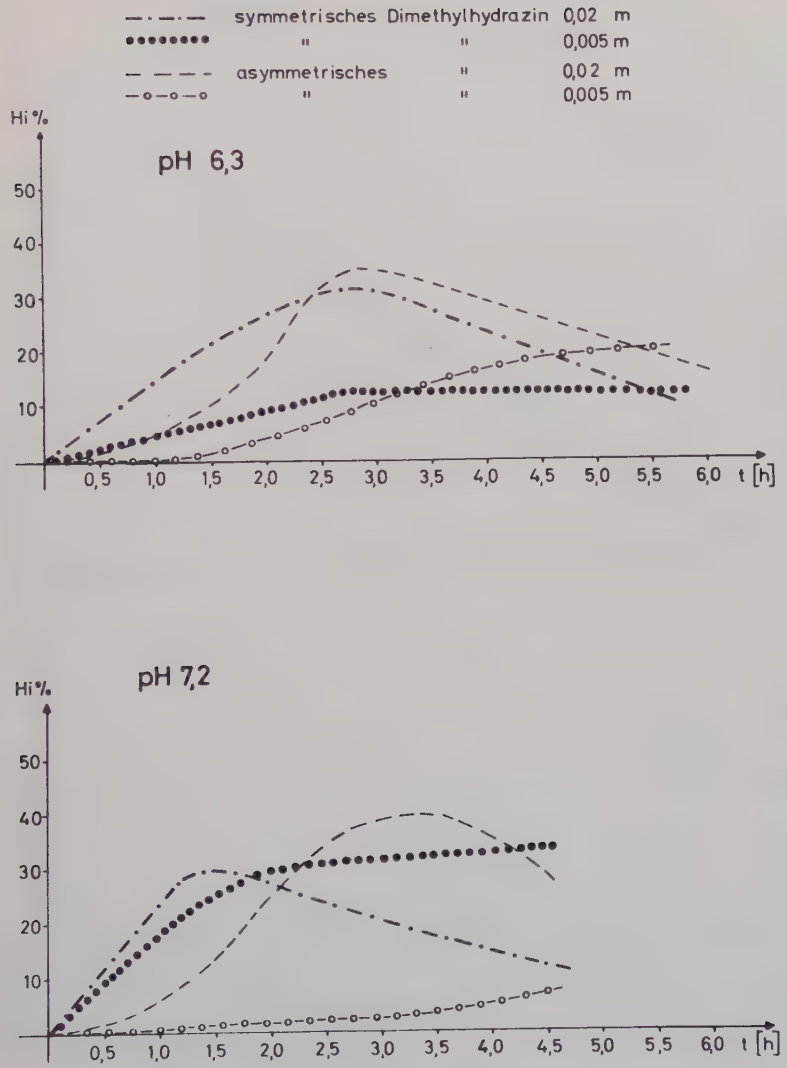


Abb. 8: Kinetik der Methämoglobinbildung von 1 %Hämolysat mit symmetrischem und asymmetrischem Dimethylhydrazin bei 37° C (vergl. auch Abb. 9)

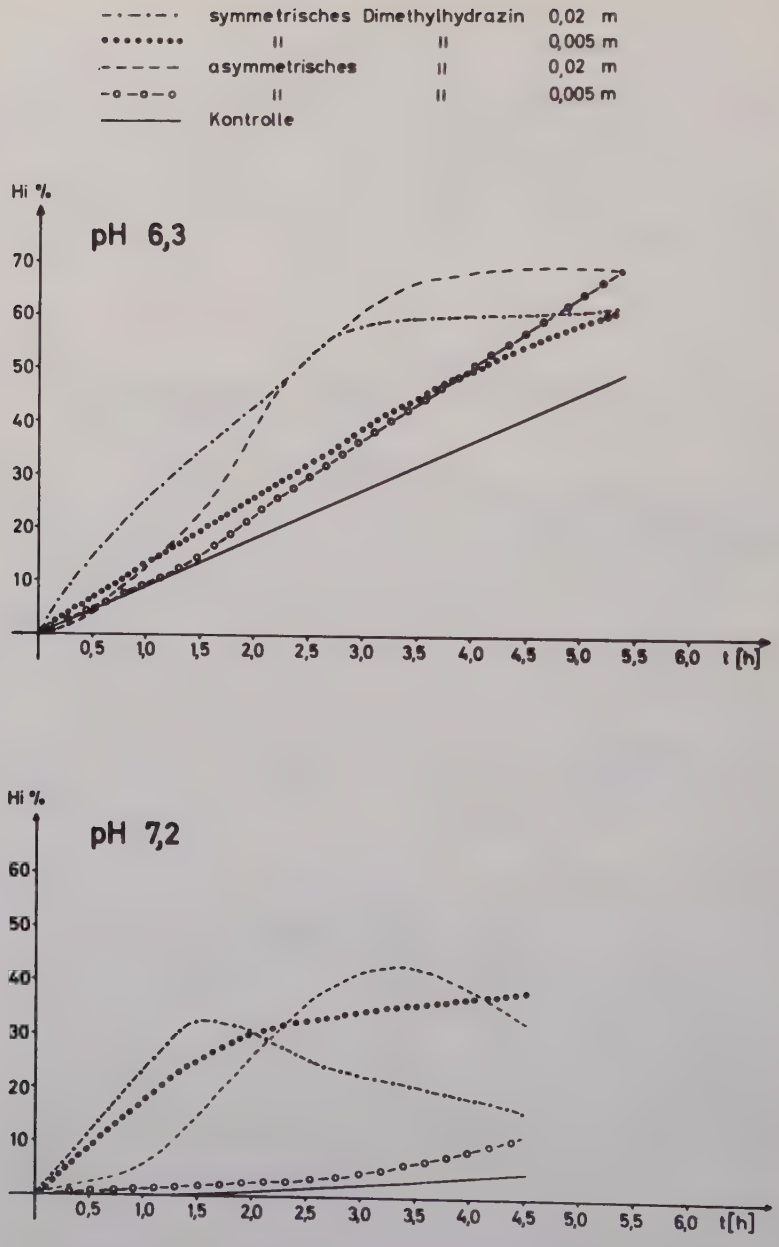


Abb. 9: Kinetik der Methämoglobinbildung von 1 % Hämolysat bei symmetrischem und asymmetrischem Dimethylhydrazin bei 37° C ohne Abzug des im Kontrollversuch gebildeten Methämoglobins (durchgezogene Linie).

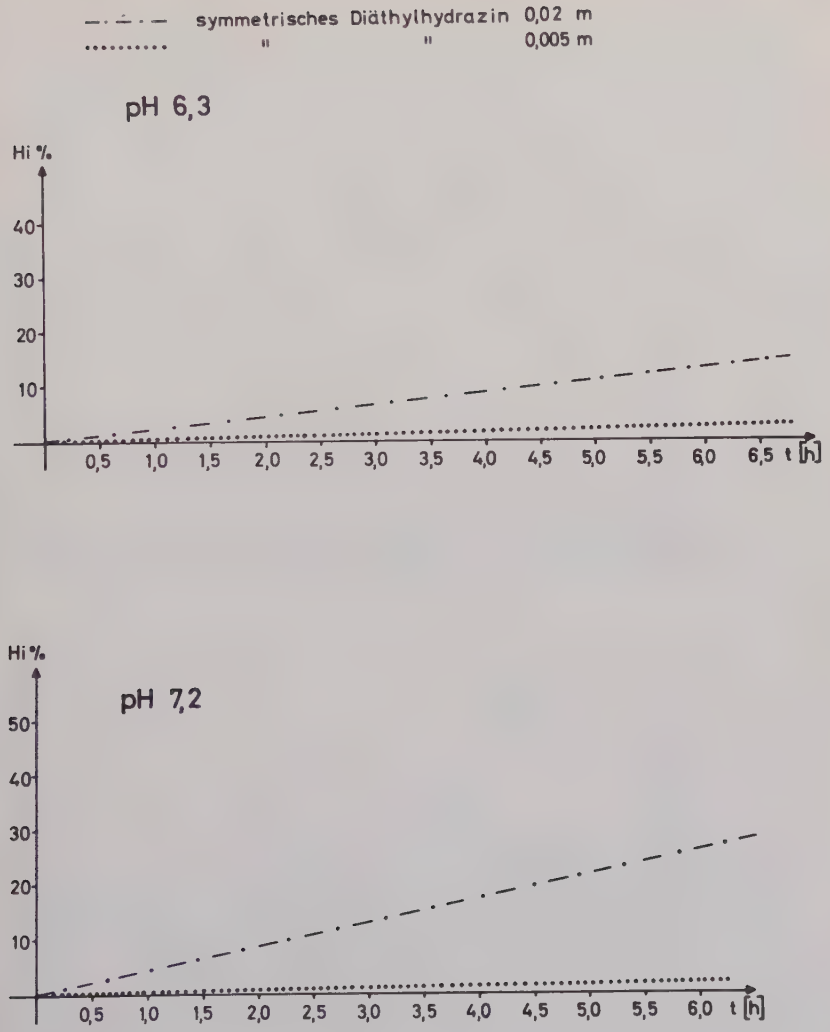


Abb. 10: Kinetik der Methämoglobinbildung von 1 % Hämolysat mit symmetrischem Diäthylhydrazin bei 37° C.

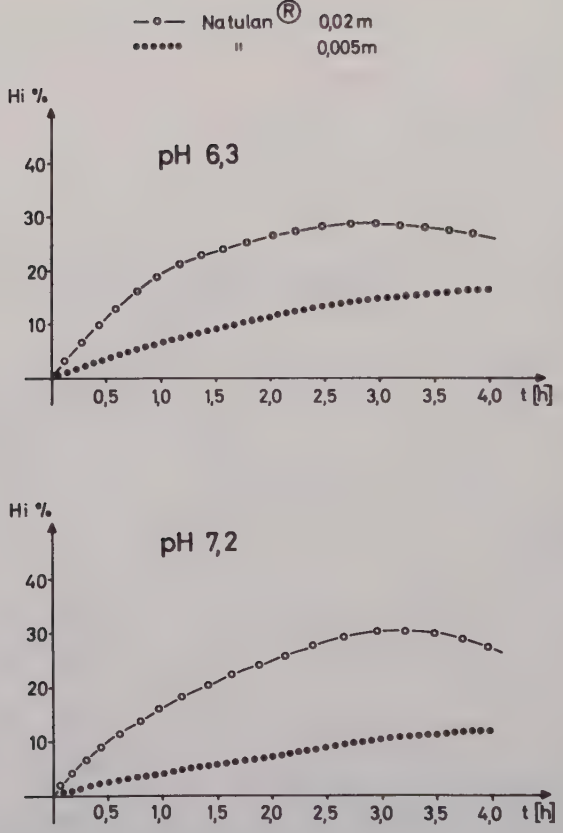


Abb. 11: Kinetik der Methämoglobinbildung von 1 % Hämolysat mit Natulan(R) bei 37° C.

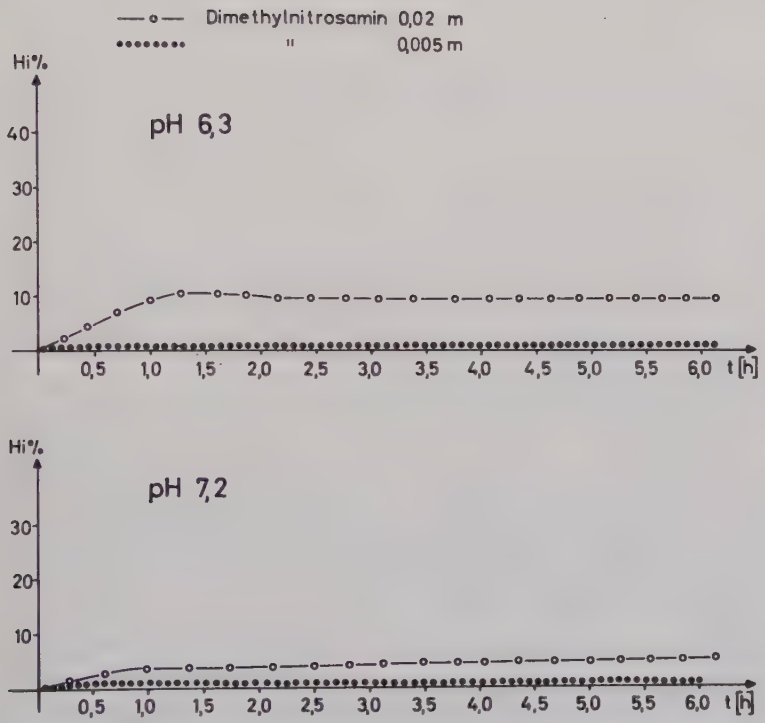


Abb. 12: Kinetik der Methämoglobinbildung von 1 % Hämolysat mit Dimethylnitrosamin bei 37° C.

3.4.1.3. Symmetrisches Diäthylhydrazin (Abb. 10)

Der Einfluß der Substituenten macht sich durch geringere Methämoglobinbildung beim symmetrischen Diäthylhydrazin schon sehr stark bemerkbar. In beiden pH-Bereichen zeigt sich ein linearer Anstieg des Methämoglobingehaltes, was darauf schließen läßt, daß eine Methämoglobinzerstörung nahezu ausgeschaltet ist. Auch zeigt sich hier deutlich, daß bei in neutral bis alkalisch gehendes pH die Methämoglobinbildung schneller vonstatten geht als bei saurem pH.

3.4.1.4. Natulan$^{(R)}$ (Abb. 11)

Natulan nimmt unter den eingesetzten Hydrazinen eine Sonderstellung ein. Man kann es als einseitiges Methylhydrazin betrachten, das auf der anderen Seite einen langen Substituenten mit einem Phenylrest trägt.
In höheren Konzentrationen (o,o2 m) zeigt sich im Vergleich zu Diäthylhydrazin eine eindeutige und bei beiden pH beinahe gleiche Methämoglobinbildung. In der niedrigen Konzentration von o,oo5 m ist die Methämoglobinbildung beim sauren pH etwas stärker. Auch hier scheint wieder eine hämoglobinzerstörende Wirkung eine Rolle zu spielen.

3.4.1.5. Dimethylnitrosamin (Abb. 12)

Im Vergleich zu asymmetrischem Dimethylhydrazin erhält man mit Dimethylnitrosamin bei beiden pH und in beiden Konzentrationen nur verschwindend wenig Methämoglobin.

3.4.2. Zusammenfassung mit stöchiometrischer Betrachtung

Aus den Kinetiken läßt sich für die Hydrazine mit Ausnahme von Natulan mit steigender Kettenlänge eine deutliche Abnahme der Schnelligkeit der Methämoglobinbildung ableiten. Natulan$^{(R}$ nähert sich in seinem Reaktionstyp dem symmetrischen Dimethyl-

hydrazin. Auch die Hämoglobin- und Methämoglobinzerstörung nimmt ab. Der Einfluß des pH zeigt, daß ein saurer pH diese Reaktion langsamer ablaufen läßt .

Bei einer groben stöchiometrischen Betrachtung kann man bei o,oo5 m Dimethylhydrazin davon ausgehen, daß im Schnitt bis zu 50 % des Hämoglobins zu Methämoglobin oxydiert werden (bei pH 7,2).

Geht man davon aus, daß in 100 ml Blut ca. 13 g Hämoglobin gelöst sind und setzt ein Molekulargewicht von 64.000 mit 4 Redoxäquivalenten $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ voraus, so kann man daraus die Redoxnormalität des Eisens berechnen. Für 1 % Hämolysat ist sie etwa 8.10^{-5}n. Werden 50 % Methämoglobin gebildet, kommt das einer Umsetzung von 4.10^{-5} mol Eisen gleich. Dazu sind mindestens 4.10^{-5} mol oxydierendes Produkt aus Dimethylhydrazin nötig, was einer Umsetzung von mindestens ca. 1 % gleich käme, wenn man Nebenreaktionen ausschließt und davon ausgeht, daß die Reaktion nur in einer Richtung verläuft. In einem 100 ml Ansatz würden somit ca. 0,08 g Dimethylhydrazin umgesetzt.

Bei der Abflachung der Kurven laufen sicher mehrere Prozesse nebeneinander ab. Die methämoglobinzerstörende Wirkung ist mit ausschlaggebend für die rückläufige Wirkung. Für eine Verlangsamung der Reaktion kann man die Abnahme an Oxyhämoglobin und damit eine Abnahme eines das Hydrazin oxydierenden Produktes in Betracht ziehen. Die Zerstörung des Gesamthämoglobins beginnt - wie in einigen Versuchen mit Hydrazin und den Dimethylhydrazinen nachgewiesen - schon ziemlich bald und läuft nahezu konstant.

3.5. Methämoglobinbildung durch Hydrazine im mikrosomalen System

Da die Leber in ihrem Fremdstoffmetabolismus über eine Vielfalt von Möglichkeiten, insbesondere eine oxydative Wirkung am Aminstickstoff verfügt, wurden Untersuchungen im mikrosomalen System der Leber gemacht.

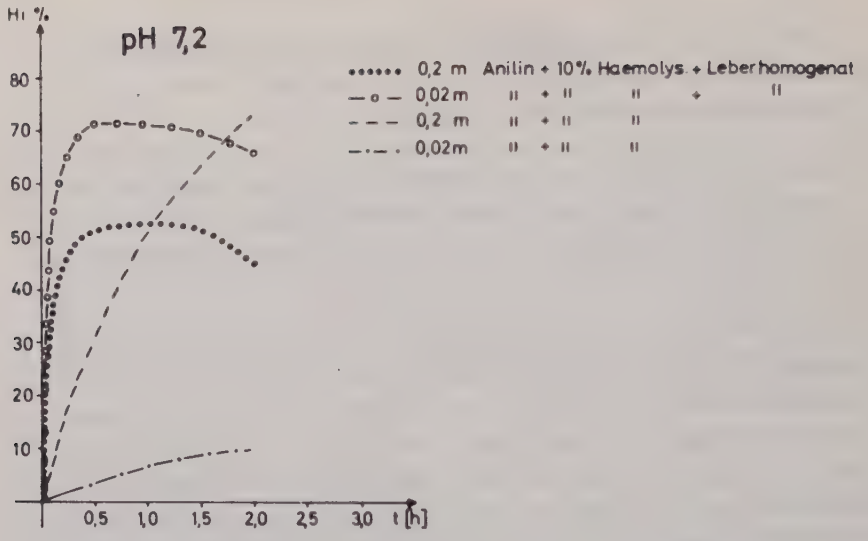


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der Methämoglobinbildung durch Anilin im System Hämolysat-Leberhomogenat im Vergleich zu Anilin in reinem Hämolysat.

3.5.1. Vorversuche mit Anilin und Hydrazinen

Wie bekannt (12, 19) bildet Anilin mit Leberhomogenat in einem Kreisprozeß über Phenylnitrosamin und Phenylhydroxylamin Methämoglobin. Bei eigenen Versuchen reichte eine Konzentration von o,o2 m Anilin in 10 % Hämolysat mit Leberhomogenat bereits aus, um 70 - 80 % Methämoglobin innerhalb 15 Min. zu bilden, während ohne Homogenat nur wenig Methämoglobin in der gleichen Zeitdauer gebildet wurde (Abb. 13). Dieser Anilinansatz wurde als Kontrolle für die Funktionstüchtigkeit des Homogenatsystems genommen. O,2 m Anilin erzeugt auch ohne Homogenat, zwar nicht so schnell, Methämoglobin. Der Versuch zeigt gleichzeitig, daß der Prozeß schneller abläuft, als im Blut. Offenbar spielen sich im Leberhomogenat neben den Methämoglobin bildenden auch Methämoglobin abbauende Reaktionen ab, wie aus dem Abfall der

Methämoglobinkonzentration hervorgeht. In diesem Sinn ist auch die geringere Methämoglobinbildung des o,2 m Anilins im Vergleich zum o,o2 m zu deuten.
Wie Vorversuche ergaben, mußte für eine eindeutig nachweisbare Methämoglobinbildung durch Hydrazine eine wesentlich höhere Konzentration (o,1 m) eingesetzt werden.

Auch hier wurden für jede Konzentration mehrere Versuche angestellt. Die Abweichungen zwischen den einzelnen Werten waren wesentlich geringer als bei den vorangegangenen Kinetikkurven. Im reinen Blindversuch ohne Hydrazin und ohne Anilin wurde kein Methämoglobin gebildet.

3.5.2. Hydrazinsulfat (Abb. 14)

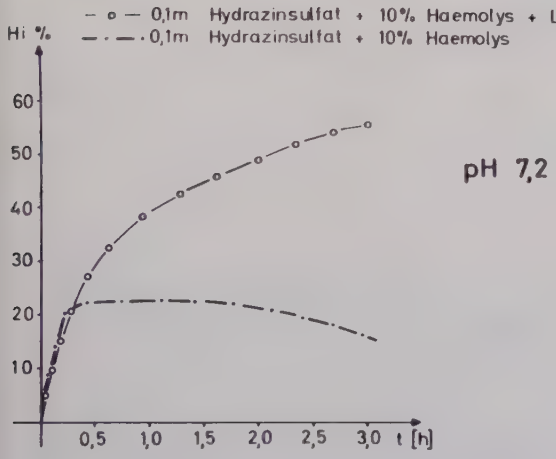


Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der Methämoglobinbildung durch Hydrazinsulfat im System Hämolysat-Leberhomogenat im Vergleich zu Hydrazinsulfat in reinem Hämolysat.

Bei Hydrazinsulfat ergibt sich mit und ohne Homogenat eine sehr schnelle Methämoglobinbildung. Diese hohe Anfangsgeschwindigkeit verlangsamt sich allmählich im Homogenatversuch und es werden bis zu 50 % Methämoglobin erreicht. Im reinen Hämolysat erhält man im Gegensatz dazu wieder nur ca. 20 % Methämoglobin und dann ein langsames Abfallen der Kurve, was wieder Hämoglobinzerstörung bedeutet. Offenbar wird im Homogenat die zerstörende Wirkung auf andere Weise abgefangen.

3.5.3. Symmetrisches und asymmetrisches Dimethylhydrazin (Abb. 15)

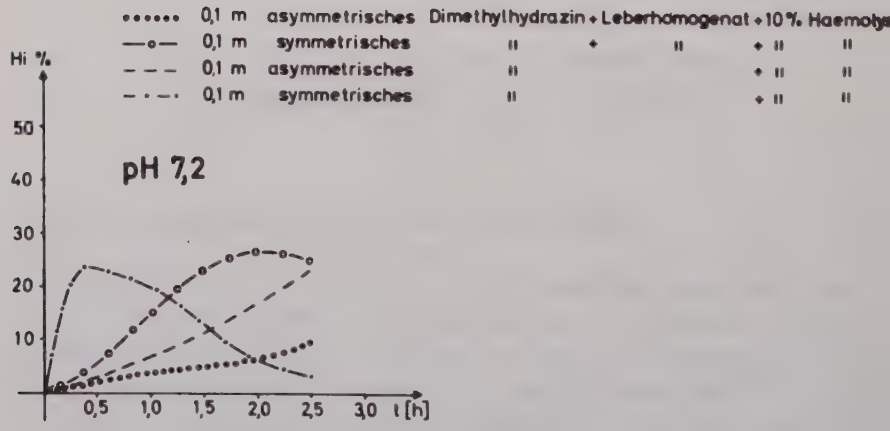


Abb. 15: Zeitlicher Verlauf der Methämoglobinbildung durch symmetrisches und asymmetrisches Dimethylhydrazin im System Hämolysat-Leberhomogenat im Vergleich zu symmetrischem und asymmetrischem Dimethylhydrazin in reinem Hämolysat.

Auch hier zeigen sich wieder in den Vergleichkurven ohne Homogenat nahezu die gleichen Kurvenbilder wie in den Kinetikversuchen: Asymmetrisches Dimethylhydrazin langsamer Reaktionsbeginn, symmetrisches Dimethylhydrazin steiler Anstieg der Methämoglobinwerte.

Interessant sind dagegen die Kurven mit Leberhomogenat, die sich sehr deutlich von den reinen Hämolysatkurven absetzen, da die Methämoglobinbildung langsamer verläuft. Dagegen ist auch hier der methämoglobinabbauende Effekt abgefangen.

3.5.4. Symmetrisches Diäthylhydrazin (Abb. 16)

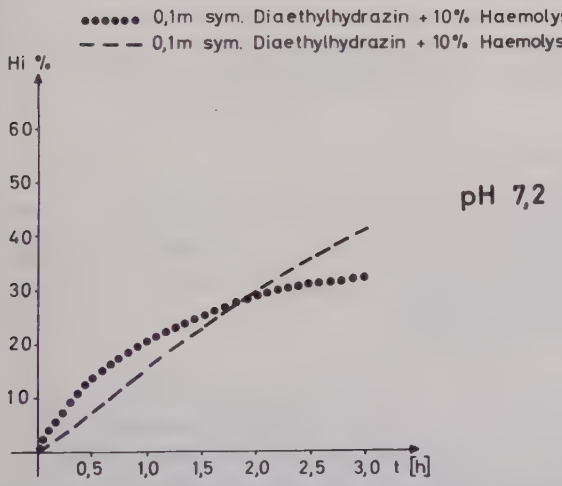


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der Methämoglobinbildung durch symmetrisches Diäthylhydrazin im System Hämolysat-Leberhomogenat im Vergleich zu symmetrischem Diäthylhydrazin in reinem Hämolysat.

Auch hier zeigt der Versuch ohne Homogenat wieder den geradlinigen Verlauf wie in den Kinetikversuchen. Mit Homogenat erhält man dagegen eine ziemlich hohe Anfangsgeschwindigkeit, die jedoch nachläßt und nicht das Maximum der Methämoglobinkonzentration ohne Homogenat erreicht. Nach diesen Ergebnis-

Einfluß. Offenbar wird im Redoxsystem der Leber schneller eine hämoglobin- und methämoglobinschädigende Verbindung aufgebaut als im Redoxsystem des Hämoglobins allein.

3.5.5. Natulan(R) (Abb. 17)

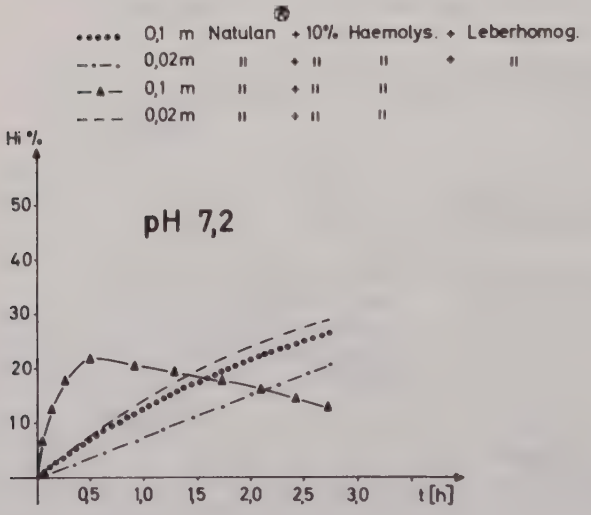


Abb. 17: Zeitlicher Verlauf der Methämoglobinbildung durch Natulan(R) im System Hämolysat-Leberhomogenat im Vergleich zu Natulan(R) in reinem Hämolysat.

Ausgehend vom vorangegangenen Versuch war es nun interessant, wie sich Natulan verhalten würde. Hier zeigt sich jedoch wieder, wie bei den Kinetikversuchen, die stärkere Anlehnung an die methylierten Hydrazine, speziell das symmetrische Dimethylhydrazin. Sehr deutlich ist das bei den o,1 m Konzentrationen, wo auch die Anfangsgeschwindigkeit ohne Homogenat schnell gegenüber der mit Homogenat ist. Der Unterschied bei der o,o2 m Konzentration ist ebenfalls sehr gut zu erkennen, wobei hier die methämoglobinzerstörende Wirkung wegfällt.

3.5.6. Dimethylnitrosamin (Abb. 18)

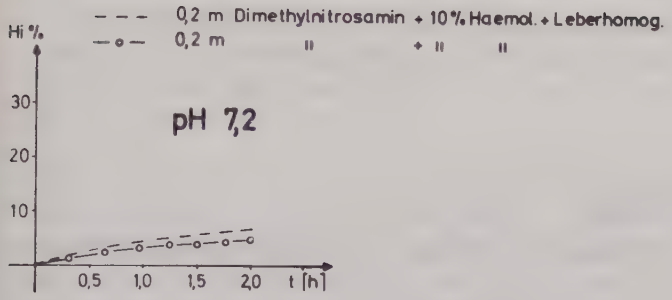


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Methämoglobinbildung durch Dimethylnitrosamin im System Hämolysat-Leberhomogenat im Vergleich zu Dimethylnitrosamin in reinem Hämolysat.

Wie in den Kinetikversuchen, zeigt sich auch hier, daß Dimethylnitrosamin kein oder nur wenig Methämoglobin bildet, obwohl hier eine noch stärkere Konzentration eingesetzt wurde.

3.5.7. Zusammenfassung

Bei allen Hydrazinen ist die Anfangsgeschwindigkeit der Methämoglobinbildung gegenüber den Versuchen ohne Mikrosomen verlangsamt. In den meisten Fällen ist die erreichte Endkonzentration an Methämoglobin im Homogenatansatz jedoch höher als ohne Homogenat bei Versuchsabbruch. Auch hier macht das symmetrische Diäthylhydrazin wieder eine Ausnahme. Eine Erklärung für dieses Verhalten wäre die größere Kettenlänge und eine damit verbundene

Stabilisierung eines methämoglobinbildenden und hämoglobinzerstörenden Produktes, das nicht so schnell abgebaut werden kann. Es hat den Anschein, daß bei den anderen Hydrazinen die hämoglobinzerstörende Komponente schneller abgebaut oder durch andere Reaktionspartner abgefangen wird als im System ohne Homogenat.

3.6. Tierversuche

3.6.1. Untersuchung der Wirkung von Hydrazinen an der Ratte

Da Hydrazine in vitro Methämoglobin erzeugen, sollte nun auch im Tierversuch festgestellt werden, ob Methämoglobin in vivo entsteht. Es wurden ca. 200 g schweren Ratten folgende Dosen verabreicht. (Sie liegt für Hydrazinsulfat bei 25 - 30 % der DL 50).

Hydrazinsulfat	60 mg/kg
Symmetrisches und asymmetrisches Dimethylhydrazin als Hydrochlorid	80 mg/kg
Symmetrisches Diäthylhydrazin als Hydrochlorid	100 mg/kg
Hydroxylaminhydrochlorid	60 mg/kg

Die Lösungen wurden alle auf pH 7,4 gepuffert und subcutan injiziert mit Ausnahme der Hydroxylaminlösung, die als Vergleichssubstanz diente und 20 Min. vor der ersten Blutentnahme gespritzt wurde. Nach 1 1/2 Std. wurde zum ersten Mal Blut aus der Schwanzvene entnommen. Weder bei dem unbehandelten Kontrolltier noch bei den mit Hydrazinen gespritzten hatte sich Methämoglobin gebildet, während bei dem mit Hydroxylamin behandelten Tier ca. 15 % Methämoglobin nachgewiesen wurde. Nach drei Stunden wurde nochmals Blut entnommen. Die Hydrazintiere zeigten immer noch keine Methämoglobinbildung; das Hydroxylamintier hatte noch einen Methämoglobinwert von ca. 5 %. Eine Methämoglobinbildung war nicht mehr zu erwarten; der Versuch wurde abgebrochen. Da sich diese Hydrazindosen als unwirksam erwiesen, wurde ein neuer Versuch mit der jeweils doppelten Dosis durchgeführt. In diesem Versuch wurde

auch Natulan(R) mit 400 mg/kg eingesetzt. Die Hydrazine wurden diesmal intraperitoneal injiziert, Hydroxylamin wiederum 20 Min. vor der ersten Blutentnahme.
Die mit Hydroxylamin gespritzte Ratte verendete nach 35 Min., begleitet von Krämpfen, an einer akuten Methämoglobinämie. Bei der Blutentnahme nach 20 Min. ergab sich eine Konzentration von 46,4 % Methämoglobin.

Die mit Hydrazinen behandelten Ratten zeigten sowohl bei den 1,5 Std. als auch bei den 3 Std.-Werten wiederum keine Methämoglobinbildung.
Das mit Natulan(R) behandelte Tier hatte nach ca. 1 Std. beginnende Motilitätsstörungen mit taumelndem Gang, schwache Reflexe und nach ca. 3 Std. Übergang in ein narkoseähnliches Stadium. Der Tod erfolgte nach ca. 6 Stunden; auch hier war bei allen entnommenen Proben nach 1,5 und 3 Stunden kein Methämoglobin nachweisbar.

3.6.2. Zusammenfassung

Die Tierversuche zeigen, daß auch hohe Dosen der untersuchten Hydrazine kein Methämoglobin erzeugen können, wie es in vitro der Fall ist.

4. Chemisch-physikalische Untersuchungen

4.1. Aldehydbildung

4.1.1. Nachweis von Formaldehyd und Acetaldehyd

Durch Oxydation von alkylierten Hydrazinen entstehen die den Alkylgruppen entsprechenden Aldehyde, wenn das N-ständige C-Atom nur ein oder kein benachbartes C-Atom trägt (20). Im Fall der Dimethylhydrazine muß Formaldehyd, des Diäthylhydrazins Acetaldehyd entstehen. Nach Oxydation sowohl im Hämolysat als auch mit Dichlorphenolindophenol oder Luft ließ sich durch die eingangs beschriebene Methode aus beiden Dimethyl-

hydrazinen Formaldehyd und aus Diäthylhydrazin Acetaldehyd nachweisen. Der Nachweis wurde aus dem Standardansatz mit o,o2 m Alkylhydrazin geführt. Um sicherzugehen, daß Aldehyd nicht beim Ansäuern der auf pH 7,2 gepufferten Lösung entsteht, wurde ein Acetaldehydnachweis aus einem Standardansatz mit Blut pH 7,2 und o,o2 m Diäthylhydrazin geführt. Nach 1 1/2-stündigem Schütteln im Wasserbad wurde die Lösung auf Acetaldehyd untersucht. Der Nachweis gelang in der gleichen Stärke, wie aus einem mit Salzsäure angesäuertem Ansatz. Aus einer frischen o,o2 m Diäthylhydrazinlösung pH 7,2 konnte nach der Destillation kein Acetaldehyd nachgewiesen werden. Ebenso nicht aus einer wieder angesäuerten Lösung.

Auch Formaldehyd konnte im Destillat einer frischen, gepufferten (pH 7,2) und wieder angesäuerten Lösung von o,o2 m symmetrischem Dimethylhydrazin nicht nachgewiesen werden. Dies war immer erst nach der Oxydation möglich. Im Hämolysatsystem war visuell immer etwas weniger Formaldehyd nachzuweisen als z.B. durch die Oxydation an Luft.

Mit Natulan konnte aus dem vergleichbaren System Hämolysat und Luftoxydation überhaupt kein Nachweis auf Formaldehyd geführt werden. Bei der Oxydation einer O,2 m Lösung pH 7,2 von Natulan mit 5 ml einer 10^{-4} m Dichlorphenolindophenollösung konnte eine ganz geringe Menge Formaldehyd nachgewiesen werden. Vergleichbare Proben mit Dimethylhydrazin und Diäthylhydrazin ergaben um vieles stärkere Nachweise auf die entsprechenden Aldehyde. Auch stärkere Oxydationsmittel wie z.B. Kaliumhexacyanoferrat (III) führten bei Natulan zu keinem anderen Ergebnis (21). Im System mit Leberhomogenat konnte weder Formaldehyd noch Acetaldehyd (bei Diäthylhydrazin) nachgewiesen werden. In diesem System dürften die Aldehyde sofort zur entsprechenden Säure weiter oxydiert werden.

4.1.2. Quantitative Bestimmung von Formaldehyd

Es wurden mit symmetrischem Dimethylhydrazin o,o2 m zwei Standardansätze à 100 ml an Luft bei 37° C geschwenkt, wobei ein Ansatz kein Hämolysat enthielt. Es sollte festgestellt werden, wieviel Prozent Formaldehyd in Gegenwart von Hämolysat und ohne Hämolysat nachgewiesen werden können. Es wurde nach 10,

25, 40 und 60 Minuten je 10,00 ml entnommen und aus den Proben quantitativ Formaldehyd bestimmt. Gleichzeitig wurde auch noch der Methämoglobingehalt festgehalten.
Die entnommenen Proben wurden mit Salzsäure versetzt, bei -30° C eingefroren und vor der Destillation aufgetaut (Tab.7)

Entnahmezeit	10'	25'	40'	60'
% gebildetes Methämoglobin	8,2	14,8	19,5	24,6
% gebildetes Formaldehyd + Blut	$1,9.10^{-5}$	$1,9.10^{-5}$	$1,5.10^{-5}$	$2,8.10^{-5}$
% gebildetes Formaldehyd ohne Blut	$3,1.10^{-5}$	$4,9.10^{-5}$	$7,1.10^{-5}$	$22,0.10^{-5}$

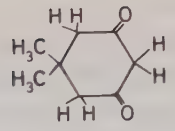
Tabelle 7: Formaldehydmenge beim Schütteln von symmetrischem Dimethylhydrazin o,o2 m an Luft mit und ohne Hämolysat.

Die Werte zeigen, daß mit Hämoglobin zwar Formaldehyd gebildet wird, jedoch immer eine ganz bestimmte Menge erhalten bleibt. Formaldehyd wird im System Blut offenbar schneller zu Ameisensäure oxydiert als im System ohne Blut. Ohne Hämoglobin steigt der Wert stetig an, da weniger Formaldehyd weiter oxydiert wird oder durch Reaktion mit Proteinen verbraucht wird.

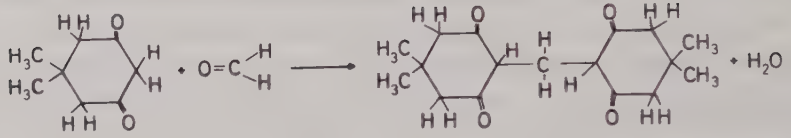
4.1.3. Nachweis von Formaldehyd mit Dimedon (21, 22)

Es wurden jeweils o,o5 m Lösungen pH 5,0 von symmetrischem und asymmetrischem Dimethylhydrazin und von Natulan gemacht. Zu 10 ml dieser Lösungen kamen jeweils 10 ml einer o,o25 m Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lösung. Die Ansätze wurden 2 Std. im Wasserbad bei 37° C und Luftzutritt geschwenkt und anschließend filtriert. 10 ml des Filtrates wurden mit 25 ml

Dimedon



Dimedonreaktion mit Formaldehyd



einer o,o4 %igen wässrigen Dimedonlösung versetzt und 24 Std. stehengelassen. Der Ansatz mit Natulan zeigte bei diesem Versuch den bei weitem stärksten Niederschlag, während die beiden Hydrazine viel weniger aufweisen konnten. Betrachtet man beide Nachweisverfahren für Formaldehyd, so liegt die Vermutung nahe, daß die Methylhydrazine durch Oxydation freien Formaldehyd bilden, während Natulan eine methylierende Gruppe ausbildet, aber Formaldehyd nur in geringem Maß abspaltet.

4.2. Chromatographische Analysen

Es standen drei Systeme zur Verfügung, die das hämoglobinoxydierende Produkt erzeugten:

1. Hämolysat - Hydrazine
2. an Luft geschüttelte Hydrazinlösung
3. Dichlorphenolindophenol-Hydrazine

Die beiden letzten der drei Systeme reichern das Hämoglobin oxydierende Produkt an, während es im Hydrazin-Hämolysatsystem nicht angereichert wird, da es sofort durch die Oxydation des Hämoglobins zu Methämoglobin entfernt wird.
Aus den beiden anderen Systemen müßte sich das Produkt isolieren lassen. Hierzu wurde die dünnschichtchromatographische Methode zur Detektion und die präparative Chromatographie zur Analyse benutzt.

4.2.1. Versuche zur dünnschichtchromatographischen Trennung der eingesetzten Hydrazine

Von G. Neurath et al. (18) wurde Fließmittel II (Chloroform, Methanol, 95/5) als geeignetes Trennmittel für Hydrazine auf Kieselgel G angegeben. Da bei allen Versuchen die Hydrazine als Salze starker Säuren vorlagen und nicht als freie Basen, mußte ein Fließmittel gefunden werden, das durch Ionenaustausch die Hydrazine freisetzt, oder deren Salze transportiert. Mit o.a. Fließmittel blieben die Hydrazine auf dem Startfleck liegen.

Versuche mit konzentrierter Ammoniaklösung als basischem Zusatz zum Fließmittel (Methanol, Chloroform, NH_3 25 %ig 50/45/5) brachten keine guten Ergebnisse: die Flecke waren verschmiert. Zusatz von Wasser brachte das gleiche Ergebnis (Methanol, Chloroform, Wasser 50/45/5). Schließlich fiel die Wahl auf Diäthylamin. Ein Zusatz von 5 ml Diäthylamin zu 90 ml Chloroform und 5 ml Methanol (Fließmittel I) war ausreichend, um die verwendeten Hydrazine gut auf Kieselgel GF und PF zu trennen (Abb. 19 - 1, 5, 8).

Zur Detektion der Flecke wurde die Floureszenzlöschung im kurzwelligen UV-Licht (254 nm) herangezogen und als Sprühmittel 1,5 %ige äthanolische Pikrylchloridlösung (23) angewendet. Mit dem Sprühreagens färbten sich Hydrazin und die asymmetrisch alkylierten Hydrazine dunkelbraun, symmetrisch alkylierte Hydrazine hellbraun auf gelbem Grund. Das Einstellen in eine mit Ammoniakdampf gesättigte Kammer erübrigte sich, da aus dem Fließmittel noch genügend Diäthylamin in der Sorptionsschicht haftete.

4.2.2. Chromatographie umgesetzter Hydrazine

Es war zu erwarten, daß das oxydierende Produkt der alkylierten Hydrazine beständiger ist als das des nicht substituierten Hydrazins. Daher wurden einige chromatographische Versuche mit, durch Dichlorphenolindophenol-Lösung oxydiertem, symmetrischem Dimethylhydrazin durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, daß

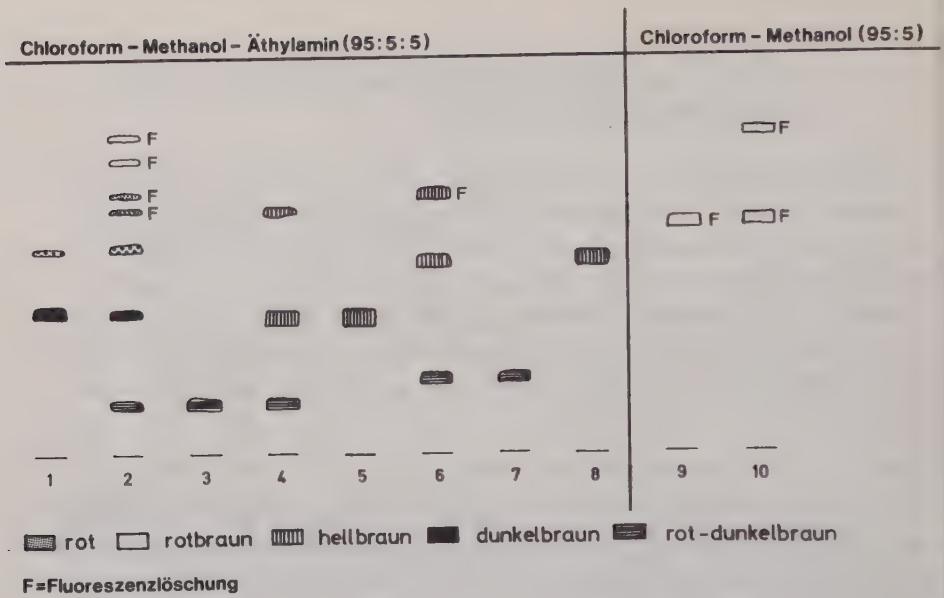


Abb. 19: Dünnschichtchromatogramm von Hydrazinen und deren Oxydationsprodukten.

Sorptionsschicht: Kieselgel GF

Detektion: a) UV 254 nm, b) 1,5 % äthanolische Pikrylchloridlösung.

Die unteren Querstriche sind die Startflecke; der obere Querstrich die Fließmittelgrenze.

1: asymmetrisches Dimethylhydrazin als Base gelöst und auf pH 7,2 gepuffert. Die reine Base ergibt nur den Fleck bei Rf 0,37.

2: Oxydationsprodukte aus asymmetrischem Dimethylhydrazin.

3: Monomethylhydrazin als Base gelöst und auf pH 7,2 gepuffert.

4: Oxydationsprodukte aus symmetrischem Dimethylhydrazin.

5: Symmetrisches Dimethylhydrazin als Hydrochlorid gelöst und auf pH 7,2 gepuffert.

6: Oxydationsprodukte aus symmetrischem Diäthylhydrazin.

7: In 1-n Salzsäure gelöstes Azoäthan ca. 1 h gestanden und anschließend auf pH 7,2 gepuffert: Monoalkylhydrazin.

8: Symmetrisches Diäthylhydrazin als Hydrochlorid gelöst und auf pH 7,2 gepuffert.

9: Destillat aus oxydiertem symmetrischem Diäthylhydrazin.

10: Azoäthan.

Dichlorphenolindophenol auf der Platte reoxydiert wurde und einen großen, blauen Fleck bei Rf o,13 zurück ließ. Daher wurde nur noch mit an Luft oxydierten Hydrazinlösungen gearbeitet.

Bei diesen Versuchen wurden 10 ml einer o,2 m auf pH 7,2 eingestellten Lösung der Hydrazine im Wasserbad bei 37° C im 50 ml Erlenmeyerkolben unter Luftzutritt geschwenkt. Es wurden mit stärkeren Hydrazinkonzentrationen die gleichen Bedingungen gewählt, die, wie beschrieben, mit Hämolysat zur Methämoglobinbildung führten. Von den so behandelten Lösungen wurden 4-8 µl auf den Startfleck aufgetragen oder bandförmig aufgesprüht.

4.2.2.1. Hydrazinsulfat (Rf o,o8 dunkelbraun)

Mit Hydrazinsulfat ergaben sich sowohl im UV als auch mit Pikrylchlorid keine neuen Flecke.

4.2.2.2. Symmetrisches Dimethylhydrazin (Abb. 19; 3; Rf o,35 hellbraun)
Asymmetrisches Dimethylhydrazin (Abb.19; 1; Rf o,37 dunkelbraun)

Beide Hydrazine wurden, wie oben beschrieben, behandelt. Nach 2 Stunden im Wasserbad hatten die Lösungen einen leichten Gelbstich. Nun wurde auf den Startfleck die angegebene Menge aufgetragen; zum Vergleich daneben je 4 µl der o,2 m frisch gelösten und auf pH 7,2 gepufferten entsprechenden Hydrazine. Nach dem Entwickeln in Fließmittel I wurde unter dem kurzwelligen UV betrachtet und die in Abb. 19; 2 mit F gekennzeichneten Fluoreszenzlöschungen registriert (asymmetrisches Dimethylhydrazin Rf o,81; o,75; o,66; o,62). Nach dem Besprühen mit Pikrylchlorid zeigte sich eine große Anzahl neuer Flecke (Abb. 19; 2 und 4). Hier muß angemerkt werden, daß asymmetrisches Dimethylhydrazin (Abb. 19; 1) nur den Fleck bei o,37 ergab, wenn es als Base frisch gelöst, aufgetragen und sofort entwickelt wurde. Der Fleck bei Rf o,52 erschien erst, wenn die Lösung vorher mit 1 n Salzsäure auf pH 7,2 eingestellt wurde.

Die durch Luftoxydation neu entstandenen Flecke mußten näher untersucht und, wenn möglich, identifiziert werden. Hierfür wurde symmetrisches Dimethylhydrazin herangezogen.

1,5 ml einer,wie oben beschrieben, behandelten o,2 m Lösung wurde bandförmig auf eine Hälfte einer Kieselgel PF-Platte aufgesprüht; als Vergleich daneben 1,5 ml einer o,2 m frischen und ebenfalls auf pH 7,2 gepufferten Lösung. Nach dem Entwickeln in Fließmittel I und dem Besprühen mit Pikrylchlorid konnte festgestellt werden, daß sich die Rf-Werte der einzelnen Flecke gegenüber denen auf Kieselgel GF nur unwesentlich unterschieden. Eine ebenso gute Trennung war sichergestellt. Die aufgesprühte Reinsubstanz erschien bei Rf o,35,und es zeigten sich keine weiteren Flecke. Die an Luft oxydierte Lösung zeigte wieder die Flecke bei Rf o,13; o,35 und o,62. In dem nun folgenden Versuch wurden 3 ml einer, wie oben vorbehandelten, o,2 m Lösung von symmetrischem Dimethylhydrazin pH 7,2 auf eine Kieselgel PF-Platte über deren ganze Breite als Startband aufgesprüht. Nach dem Entwickeln in Fließmittel I wurden nur die äußersten Ränder mit Pikrylchlorid besprüht und die Flecke angezeichnet. Im unbesprühten Teil (ca. 10 cm Breite) der Platte wurde die den Flecken entsprechenden Bänder gekennzeichnet. Die zwischen den Bändern freien Felder wurden nochmals unterteilt, so daß neun ca. 1 cm bis 1,6 cm breite Bänder vorlagen. Die angesprühten Teile der Schicht wurden entfernt, die neun Bänder einzeln abgeschabt und das Abgeschabte in je ein Reagensglas eingebracht. Das in den Reagensgläsern vorliegende Pulver der einzelnen Zonen wurde mit 4 ml eluiert und zur Sedimentation zentrifugiert. Von den Eluaten blieben noch ca. 1,5 ml Überstand; davon wurden je 1 ml in ein neues Reagensglas pipettiert und mit einigen Tropfen 1 n Salzsäure auf ca. pH 7 eingestellt. Die Lösungen waren deshalb alle alkalisch, da das Diäthylamin aus dem Fließmittel noch an der Sorptionsschicht haftete. Nach Zugabe von o,2 ml Puffer pH 7,2 wurde auf 2 ml mit Wasser aufgefüllt. Nun wurde in jede Probe o,1 ml 20 %iges Hämolysat einpipettiert und nach ca. 3 Minuten ein Spektrum geschrieben. Schon visuell konnte festgestellt werden, daß die Proben, die aus den Zonen zwischen den Flecken eluiert waren, kein Methämoglobin gebildet hatten, was sich durch Messung bestätigte.

Die den Flecken entsprechenden Zonen zeigten eine mehr oder weniger starke Methämoglobinbildung.

Rf o,62: sehr wenig Methämoglobin (unter 5 %) auch nach längerem Stehen (ca. 1 Stunde),

Rf o,35: (Symmetrisches Dimethylhydrazin) wesentlich mehr Methämoglobin als Rf o,62 (ca. 30 %) schon nach 3-minütigem Stehen,

Rf o,13: am meisten Methämoglobin von allen drei Proben nach ebenfalls 3-minütigem Stehen (ca. 40 %).

Es entstand bei reinem Dimethylhydrazin ebenfalls relativ viel Methämoglobin. Das wird damit erklärt, daß beim Aufarbeiten die Substanz weiter oxydiert wurde.

Als Methämoglobinbildner oder die direkte Vorstufe dazu, mußte die bei Rf o,13 gefundene Substanz angenommen werden. Um diese Substanz zu klassifizieren, wurde davon ausgegangen, daß, wie schon beschrieben, aus Dimethylhydrazin Formaldehyd oxydativ abgespalten wird. Nach der Abspaltung bleibt dann Monomethylhydrazin übrig ($H_3C-NH-NH_2$).

Monomethylhydrazin wurde als Vergleichssubstanz aufgetragen und ergab bei Rf o,13 mit Pikrylchlorid einen Fleck der gleichen Farbe: dunkelbraun, das nach längerem Stehen in rot überging. Zur Bestätigung wurde nun eine ab o,o2 m fallende Verdünnungsreihe mit Monomethylhydrazin pH 7,2, wie eingangs beschrieben, angesetzt (Tab. 8).

Konzentration mol	o,o2	o,o1	o,oo5	o,oo25	o,oo125
Hi % nach ca.3 Min.	30 %	30 %	20 %	10 %	5 %
Hi % nach ca.10 Min.	30 %	30 %	25 %	20 %	10 %

Tabelle 8: Methämoglobinbildung durch Monomethylhydrazin in fallender Konzentration.

Mit Monomethylhydrazin wird sehr schnell und eindeutig Methämoglobin gebildet. Es wurde auch gleichzeitig festgestellt, daß von Oxyhämoglobin bei allen Proben Sauerstoff schnell verbraucht wurde. Das für Oxyhämoglobin typische, starke Minimum bei 560 nm war gegenüber einer Blindprobe stark angehoben, was darauf hindeutet, daß neben Oxyhämoglobin auch reduziertes Hämoglobin vor-

handen ist.
Aus einem Standardansatz (pH 7,2) mit 0,02 m symmetrischem Dimethylhydrazin, der eine Stunde unter Luft geschüttelt wurde, konnte Monomethylhydrazin dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden. 20 ml Standardansatz wurden nach der Inkubationszeit mit Salzsäure auf pH 3 angesäuert und das ausgefallene Hämatin abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde in der Gefriertrocknung auf 0,5 ml eingeengt und davon ca. 20 µl auf einem Startfleck aufgetragen. Auch hier erschien nach dem Entwickeln ein schwacher Fleck bei Rf 0,13, was darauf hindeutet, daß Monomethylhydrazin gebildet wurde.

4.2.2.3. Symmetrisches Diäthylhydrazin (Abb. 19; 8 Rf 0,49 hellbraun)

Da symmetrisches Diäthylhydrazin bei allen Versuchen am langsamsten reagierte, wurden die gleichen Versuche auch mit dieser Substanz durchgeführt, da zu erwarten war, daß sich Diäthylhydrazin bei der Chromatographie weniger zersetzt.

Wie in den vorangegangenen Versuchen wurde eine 0,2 m Lösung von Diäthylhydrazinhydrochlorid auf pH 7,2 eingestellt und 3 bis 4 Stunden bei 37° C an Luft geschwenkt. Es wurden nun 8 µl auf den Startfleck einer Kieselgel GF-Platte aufgetragen und entwickelt (Fließmittel I). Bei RF 0,66 konnte im UV eine Fluoreszenzlösung ausgemacht werden, die sich mit Pikrylchlorid hellbraun anfärbte, analog symmetrischem Dimethylhydrazin. Mit Pikrylchlorid erschien auch bei Rf 0,49 Diäthylhydrazin und bei Rf 0,19 ein dunkelbrauner Fleck, der sich langsam nach rot umfärbte.
Zur präparativen Chromatographie muß angemerkt werden, daß auch hier die Flecke wieder die gleichen Rf-Werte aufwiesen wie auf den normalen Kieselgel GF-Platten. Es wurde nun, wie oben beschrieben, eine vorbehandelte Lösung von Diäthylhydrazin auf eine präparative Platte bandförmig über die ganze Breite aufgesprüht, entwickelt, mit Pikrylchlorid angefärbt, die Zonen abgeschabt und das Abgeschabte eluiert. Auch hier ergaben die Zonen, die keine Flecke aufwiesen, kein Methämoglobin.

Die Ergebnisse der Eluate aus den Flecken (Abb. 19; 6):

Rf o,66: sehr wenig Methämoglobin (unter 5 %) auch nach dreistündigem Stehen.

Rf o,49: etwas mehr Methämoglobin (5 - 10 %) nach 15-minütigem Stehen.

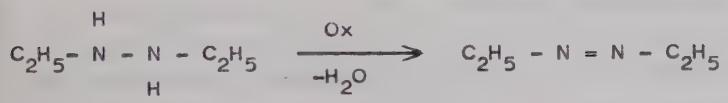
Rf o,19: nach 8 Minuten Stehen konnte sehr viel Methämoglobin (ca. 40 %) nachgewiesen werden.

Auch hier lag die methämoglobinbildende Substanz unterhalb des Fleckes für Diäthylhydrazin. Es lag die Vermutung nahe, daß es sich hier, wie bei symmetrischem Dimethylhydrazin, um Monoäthylhydrazin handeln mußte, Diäthylhydrazin selbst hatte sich auf der Platte, wie erwartet, wesentlich weniger umgesetzt als symmetrisches Dimethylhydrazin; es wurde nur ganz wenig Methämoglobin spontan gebildet.

4.3. Untersuchungen mit Azoäthan

4.3.1 Herstellung von Azoäthan

Da bei der Oxydation von alkylierten Hydrazinen deren Azoverbindungen entstehen (20) wurde aus Diäthylhydrazin nach der üblichen Vorschrift (1) durch Oxydation mit Quecksilberoxid in wässriger Lösung Azoäthan hergestellt.



Symm. Diäthylhydrazin Azoäthan

4.3.2. Dünnschichtchromatographie von in Salzsäure umgesetztem Azoäthan

Löst man Azoäthan in 1 n Salzsäure (o,2 m) und läßt längere Zeit an Luft stehen, so bildet sich nach dem Auftragen auf eine Dünnschichtplatte (Kieselgel GF) nach dem Entwickeln ein sich mit Pikrylchlorid dunkelbraun färbender Fleck (Abb. 19; 7) bei Rf o,19; hierbei handelt es sich um Monoäthylhydrazin, das beim Ansäuern aus Azoäthan unter Abspaltung von Acetaldehyd gebildet wird.

Aus einer wie oben hergestellten Lösung von Azoäthan konnte nach der Hochvakuumdestillation und anschließenden Pufferung auf pH 7 ein eindeutiger Nachweis auf Acetaldehyd erbracht werden. Reines Azoäthan, welches in Wasser emulgiert war, brachte diesen Nachweis nicht. In Salzsäure wurde also Acetaldehyd abgespalten unter Bildung von Monoäthylhydrazin.

4.3.3. Methämoglobinbildung durch in Salzsäure umgesetztes Azoäthan

Azoäthan wurde o,4 m in 1 ml 1 n Salzsäure gelöst und nach 15 Minuten die Lösung mit einigen Tropfen 20 %iger Natronlauge auf ca. pH 7 eingestellt. Durch Zugabe von Wasser wurde die Lösung auf o,2 m Azoäthan gebracht. Nach Herstellung einer Verdünnungsreihe, wie beschrieben, wurden o,5 ml der erhaltenen Lösungen zu 4,5 ml Standardansatz gegeben und nach 8 Minuten (Zimmertemperatur) ein Spektrum gemessen.

Bei den hohen Konzentrationen (o,o2; o,o1; o,oo5; o,oo25 und o,oo1 m) wurde Methämoglobin in fallender Konzentration festgestellt (25 - 10 %). Die drei höheren Konzentrationen zeigten Sauerstoffverbrauch (Nachweis von reduziertem Hämoglobin). Bei o,o2 m wurde nach 20 Minuten nur noch reduziertes Hämoglobin mit wenig Methämoglobin gemessen. Nach kräftigem Schütteln der Lösung (was einem Durchperlen mit Luft gleichkommt), traten wieder die Oxyhämoglobin- und auch die Methämoglobinmaxima auf.

Dichlorphenolindophenol wurde von der o,o2 m Lösung (wie oben) langsam entfärbt. 5 ml o,o2 m Lösung entfärbten in 8 Minuten o,5 ml einer 10^{-4} m Dichlorphenolindophenollösung. Gab man o,5 ml dieser entfärbten Lösung zu 4,5 ml Standardansatz, so wurde innerhalb 2 Minuten Methämoglobin gebildet. Gibt man zu einem auf pH 7,2 gepufferten Standardansatz reines Azoäthan (ca. o,oo5 m), so kann selbst nach 4-stündigem Stehen nur sehr wenig Methämoglobin (ca. 5 %) nachgewiesen werden.

4.3.4. Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Azoäthan

Da bei der Hochvakuumdestillation von mit Hämoglobin umgesetztem Diäthylhydrazin für den Nachweis von Acetaldehyd im Destillat der typische Geruch von Azoäthan auftrat, wurde versucht, dieses dünnschichtchromatographisch zu erfassen.

Hierzu wurden 20 ml Standardansatz pH 7,2 mit o,o2 m Diäthylhydrazin 1 Stunde bei 37° C unter Luftzutritt geschwenkt. Der Ansatz wurde der Hochvakuumdestillation unterworfen und ca. 1 ml davon überdestilliert. Nach dem Auftauen des Destillates wurden o,5 ml auf eine Kieselgel GF-Platte als ca. 2 cm breites Startband aufgesprüht. Daneben wurden zum Vergleich 2 bzw. 4 ul einer o,o1 m äthanolischen Azoäthanlösung aufgetragen. Entwickelt wurde die Platte in Fließmittel II (Chloroform-Methanol 95/5). Unter dem UV (256 nm) konnten die in Abb. 19; 9 und 10 aufgezeigten Fluorenseazlöschungen beobachtet werden. 9 (Rf o,58) zeigt die Löschung des Fleckes aus dem Destillat, 10 (Rf o,58 und o,81) die Löschungen der äthanolischen Lösung von Azoäthan, wenn man 4 µl aufträgt. Trägt man nur 2 µl auf, so kann man lediglich die Löschung bei Rf o,58 ausmachen.

5. Diskussion der Ergebnisse

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten niedrig alkylierten Hydrazinen wird im allgemeinen beim Verbrennen eine glatte und schnelle Oxydation zu Stickstoff und Wasser angenommen. Aus den hier dargelegten Versuchen geht eindeutig hervor, daß bei der langsamen Oxydation von Hydrazinen ein oxydierendes Zwischenprodukt entstehen muß, obwohl die Hydrazine nur als Reduktionsmittel gelten. Dieses Zwischenprodukt ist in der Lage, das im Hämoglobin gebundene Eisen (II) zu Eisen (III) zu oxydieren: es entsteht Methämoglobin.

Methämoglobin wird schnell durch Oxydation mit z.B. Kaliumferrizyanid, Chlorat, Nitrit u.a.m. gebildet, also durch einen direkten Elektronenübergang. Ebenso entsteht es beim Einwirken von Wasserstoffperoxyd, Sauerstoff und auch durch Autoxydation. Diese Reaktionen verlaufen jedoch langsam (24). Die Methämoglobinbildung läßt sich wie folgt formulieren:

$$Fe^{2+} \xrightarrow{ox} Fe^{3+} + e^-$$

Hämoglobin (Hb) Methämoglobin (Hi)

Ein methämoglobinbildendes Produkt entsteht aus Hydrazinen sowohl beim Stehen an Luft als auch mit geeigneten Oxydationsmitteln, wie Dichlorphenolindophenol oder dem Sauerstoff des Oxyhämoglobins.
Die Versuche mit bereits oxydierten Hydrazinen haben gezeigt, daß die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte erstens die Oxydation des Hydrazins und zweitens der Zerfall der Azoverbindung sind. Bei der langsamen Oxydation von Hydrazinen gehen diese zunächst unter Abspaltung von Wasserstoffperoxyd in die entsprechende Azoverbindung über. Es kommt dann säurekatalytisch zu einer Umlagerung in das Hydrazon und zur Spaltung in Aldehyd und Monoalkylhydrazin (1, 20, 21, 22).
Im folgenden Formelschema sei dies noch einmal für symmetrisches Dialkylhydrazin dargestellt:

$$R\text{-}CH_2\text{-}NH\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}R \xrightarrow[-H_2O_2]{Ox} R\text{-}CH_2\text{-}N = N\text{-}CH_2\text{-}R \rightleftharpoons$$

Dialkylhydrazin — Azoverbindung

$$R\text{-}CH = N\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}R \xrightarrow[+H_2O]{Spaltung} R\text{-}CHO + H_2N\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}R$$

Hydrazon — Aldehyd Monoalkylhydrazin

Diese Schritte der Reaktionsfolge wurden auch im Hämolysatsystem einzeln nachgewiesen. Eine schnelle Oxydation zur Azoverbindung ist in diesem System aufgrund der besonderen Bindung des Sauerstoffs im Hämoglobin sehr wahrscheinlich, wie auch die Bildung von Wasserstoffperoxyd. Die Oxydation wäre über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum Sauerstoff denkbar.

$$R\text{-}CH_2\text{-}NH\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}R + HbO_2 \longrightarrow Hb + H_2O_2 + R\text{-}CH_2\text{-}N = N\text{-}CH_2\text{-}R$$

Daß Wasserstoffperoxyd nicht den Methämoglobinbildner darstellt, zeigten Versuche mit 1 %igem Hämolysat, das tropfenweise mit 5 %iger Wasserstoffperoxydlösung versetzt wurde. Aufgrund der hohen Katalaseaktivität wurde Wasserstoffperoxyd sofort zerlegt, was sich mit starker Gasentwicklung bemerkbar machte. Auch nach längerem Stehen konnte Methämoglobin nicht nachgewiesen werden.

Aus den eigenen Versuchen geht hervor, daß im Hämolysat aus Alkylhydrazinen Aldehyde sowohl bei leicht alkalischem als auch bei leicht saurem pH abgespalten werden. Die Monoalkylhydrazinverbindung wurde im Fall der Dimethylhydrazine nachgewiesen. Einen Hinweis auf den ersten Schritt der Reaktion (die Azoverbindung) gab das Destillat aus mit Hämolysat umgesetztem Diäthylhydrazin. Aus dem Destillat konnte sowohl geruchlich als auch chromatographisch die Azoverbindung identifiziert werden. Aus Versuchen mit selbst hergestelltem Azoäthan geht hervor, daß die Methämoglobinbildung mit Azoäthan ebenso langsam verläuft wie mit entsprechendem Alkylhydrazin. Dies weist darauf hin,daß die Azostufe selbst nicht das oxydierende Produkt darstellt.Es muß vielmehr erst der Aldehyd abgespalten werden, um dann als Monoalkylhydrazin zur Wirkung zu kommen. Die Versuche mit in Salzsäure umgesetztem Azoäthan und vor allem die mit Monomethylhydrazin zeigen, daß das

Monoalkylhydrazin das Ausgangsprodukt zur Methämoglobinbildung ist. Es kann sich bei dem Monomethylhydrazin jedoch nicht direkt um den Methämoglobinbildner handeln, es entsteht aber aus diesem sehr schnell das oxydierende Produkt, wie die Versuche zeigten.

Das Monoalkylhydrazin wird scheinbar zunächst nochmals schnell zur Azostufe oxydiert und lagert sich zum Hydrazon um. Einen Hinweis dafür gibt auch die Entstehung von reduziertem Hämoglobin. Der weitere Verlauf der Reaktion könnte von der Azostufe über einen Radikalmechanismus verlaufen (25). Unter Aufnahme eines Protons und eines Elektrons aus dem Hämolysat könnte sich ein Radikal bilden. Ebenso auch unter Aufnahme eines Wasserstoffatoms aus einem Monomethylhydrazin unter Ausbildung zweier Radikale.

$$CH_3\text{-}NH\text{-}NH_2 \xrightarrow[-H_2O_2]{ox} CH_3\text{-}N=NH \rightleftharpoons CH_2=N\text{-}NH_2$$

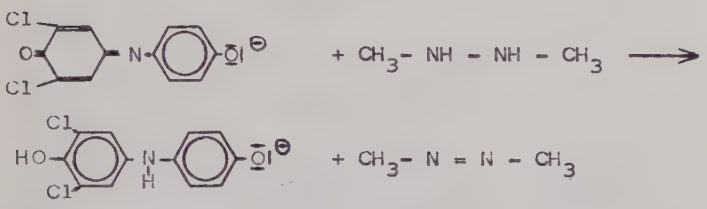
Monomethylhydrazin Azoverbindung Hydrazon

$$1.\ CH_3\text{-}\underline{N}=\overline{N}\text{-}H + Fe^{2+} + H^+ \longrightarrow CH_3\text{-}\dot{\underline{N}}\text{-}\overset{H}{\overline{N}}\text{-}H + Fe^{3+}$$

$$2.\ CH_3\text{-}NH\text{-}NH_2 + CH_3\text{-}\overline{N}=\underline{N}\text{-}H \longrightarrow 2\ CH_3\text{-}\dot{\underline{N}}\text{-}\overset{H}{\overline{N}}\text{-}H$$

Das entstandene Radikal seinerseits kann sich unter erneuter Aufnahme eines Protons und eines Elektrons (aus dem Hämeisen) zum Ausgangsprodukt zurückbilden. Somit wäre hiermit ein Kreisprozeß im Gang, der jedoch offensichtlich einen Nebenweg darstellen muß, da, wie sich gezeigt hat, zur Methämoglobinbildung eine hohe Hydrazinkonzentration notwendig ist.
Die Ausbildung eines Radikals kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, da es sich bei der Methämoglobinbildung um einen "1-Elektronen-Übergang" handelt (26). Auch dürfte die Oxydation des Hämoglobins von dieser Stufe ausgehen, da Monomethylhydrazin sehr rasch Methämoglobin bildet und Azoverbindungen als milde Oxydationsmittel mit definierten Redoxwerten Verwendung finden (27).

Die Oxydation der Hydrazine mit Dichlorphenolindophenol scheint über die gleichen Stufen abzulaufen, da auch hier der Aldehyd nachgewiesen werden konnte. Die Oxydation ließe sich wie folgt formulieren:



$$CH_3\text{-}N = N\text{-}CH_3 \rightleftharpoons CH_3\text{-}NH\text{-}N = CH_2 \xrightarrow[+H_2O]{\text{Spaltung}} CH_3\text{-}NH\text{-}NH_2 + HCHO$$

Mit dem Monoalkylhydrazin sind die Schritte bis zur Azoverbindung nochmals möglich (auch Monomethylhydrazinlösung entfärbte Dichlorphenolindophenollösung). Der Verlauf der weiteren Reaktion müßte dann,wie oben beschrieben,ablaufen. Mit Dichlorphenolindophenol alleine konnte auch nach 5-stündigem Stehen kein Methämoglobin nachgewiesen werden. Somit kann hier das Hydrazin als "Elektronenüberträger" aufgefaßt werden.

Aus den Kinetikkurven der Methämoglobinbildung läßt sich ablesen, daß Hydrazinsulfat und die symmetrisch alkylierten Hydrazine den gleichen Verlauf aufzeigen. Das asymmetrische Dimethylhydrazin fällt insofern heraus, als die Methämoglobinbildung langsam anläuft und die Kurve somit später in eine Gerade übergeht. Aus dem tg des Winkels der maximalen Steigung läßt sich die Zeit berechnen, innerhalb der 25 % Methämoglobin entstehen würden. (Tabelle 9). Hier muß angemerkt werden, daß die Anlaufzeit bei asymmetrischem Dimethylhydrazin unberücksichtigt bleibt. Für o,o2 m Hydrazinsulfat ist bei pH 7,2 die Zeit,um 25 % Methämoglobin zu bilden, länger als für die o,oo5 m Konzentration. Hier spielt sicher eine schnelle, von Anfang des Versuches beginnende Hämoglobin- und Methämoglobinzerstörung eine große Rolle.

pH	6,3		7,2	
Konzentration	0,02 m	0,005 m	0,02 m	0,005 m
Hydrazinsulfat	15'	52'	45'	14'
Symmetr. Dimethyl-hydrazin	1h 36'	5 h	1h 01'	1h 18'
Asymmetr.Dimethyl-hydrazin	50'	4h 10'	1h 06'	5h 30'
Symmetr. Diäthyl-hydrazin	11h 47'	56h 48'	5h 42'	56h 48'
Natulan (R)	1h 02'	3h 34'	1h 01'	6h 15'

Tabelle 9: Theoretische Zeiten bis zum Erreichen von 25 % Methämoglobin, berechnet aus der maximalen Steigung der Kinetikkurven.

Aus den Kinetikkurven läßt sich entnehmen, daß der pH einen großen Einfluß auf die Methämoglobinbildung hat. Besonders deutlich ist dies bei der niedrigen Konzentration des symmetrischen Dimethylhydrazines abzulesen, das bei pH 6,3 nur relativ wenig Methämoglobin und im Vergleich dazu bei pH 7,2 sehr viel Methämoglobin bildet. Symmetrisches Diäthylhydrazin macht dies nur in der höheren Konzentration deutlich. Die Methämoglobinbildung durch Natulan(R) läßt sich aufgrund der Kinetik und der in Tab. 9 angegebenen Werte recht gut mit symmetrischem Dimethylhydrazin vergleichen. Auch läßt sich aus Tab. 9 der Einfluß des pH auf die Methämoglobinbildungsgeschwindigkeit gut ableiten, wenn auch nicht bei allen Konzentrationen. Er zeigt sich bei den schnell reagierenden Hydrazinen in der niedrigen Konzentration (Hydrazinsulfat, symmetrisches und asymmetrisches Dimethylhydrazin, Natulan(R)) und bei dem langsam reagierenden Diäthylhydrazin in der höheren Konzentration.

Dem geradlinigen Anstieg der Methämoglobinbildung folgt ein langsames Abflachen der Kurve, die Methämoglobinkonzentration geht in einigen Fällen sogar zurück. Das ist darauf zurückzuführen, daß Hämoglobin und Methämoglobin zerstört und somit der Messung entzogen werden.
Die Zerstörung kann mit einer Beeinflussung des Globins durch die Hydrazine und deren Reaktionsprodukte erklärt werden. Besonders ist die Anlagerung und der Einbau (Reaktion mit freien Aminogruppen) von Formaldehyd nicht ausgeschlossen. Eine Zerstörung des Porphyrinringes oder eine Abspaltung des Globinanteiles durch die Hydrazine oder deren Oxydationsprodukte kann nicht ausgeschlossen werden, da sich nach längerem Stehen, besonders bei den Versuchen im Reagensglas bei hoher Hydrazinkonzentration die Lösungen grün färbten (Verdoglobin). Die Methämoglobinbildung beruht mit Sicherheit nicht auf der Zerstörung des im Erythrozyten vorhandenen Reduktasesystems. Eine Störung der Methämoglobinreduktase und auch des Glutathion-Reduktasesystems durch Hydrazine oder deren Oxydationsprodukte wäre denkbar. Jedoch ist auch damit eine so schnelle Methämoglobinbildung nicht zu erklären. Auszuschließen ist die Beeinflussung dieser Systeme durch Formaldehyd. Von Jung et al. (28) wird beschrieben, daß eine 3×10^{-2} mol Formaldehydkonzentration in einer 10%igen Erythrozytenaufschwemmung keine Beeinflussung auf die Reduktion des Methämoglobins hatte. Bei den hier ausgeführten Versuchen wurden jedoch nur Konzentrationen von maximal $2{,}8 \times 10^{-5}$ mol Formaldehyd in 1 %igem Hämolysat gemessen.

Der Abbau der Hydrazine im mikrosomalen System des Leberhomogenates unterscheidet sich im Verlauf der Methämoglobinbildung kaum von den reinen Hämolysatversuchen, bis auf die Menge des gebildeten Methämoglobins. Man kann annehmen, daß die Produkte, die zur Zerstörung und Oxydation des Hämoglobins führen, an Bestandteilen des Homogenates abgefangen oder daß sie sehr schnell "entgiftet" werden. Auch hier ähnelt Natulan(R) wieder den methylierten Hydrazinen.
Diese Aussagen gelten bedingt nur für Diäthylhydrazin, welches im Unterschied zu den anderen Hydrazinen im Homogenatversuch stärker wirksam war. Das könnte damit zusammenhängen, daß das oxydierende Produkt langsamer abgebaut wird.

Die Versuche mit Dimethylnitrosamin zeigen auch im System Leberhomogenat praktisch keine Methämoglobinbildung, was die Oxydation der Hydrazine zu Nitrosaminen ausschließen läßt.

Die Tierversuche haben gezeigt, daß nach Gabe auch hoher Dosen Hydrazine Methämoglobin nicht nachweisbar ist. Dies hängt mit Sicherheit an den Molverhältnissen im Ganztier. Während in vitro Konzentrationen von o,o2 bis o,oo5 m in 1 %igem Hämolysat eingesetzt wurden, waren es im Ganztier, bezogen auf das Körpergewicht ca. O,OO1 bis O,OO2 m in 1OO %igen Blutkörperchen. Die Konzentration lag somit um mehr als zwei Zehnerpotenzen tiefer als in vitro. Auch spielt hier die Entgiftung durch die Leber eine große Rolle (3). Auf jeden Fall kann die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß die Erythrozytenmembran für die Hydrazine undurchlässig ist. Dies zeigten auch einige Vorversuche mit Erythrozytensuspensionen. Es muß auch in Betracht gezogen werden, daß die Reduktaseaktivität erhalten bleibt, die offensichtlich beim Hydroxylamin nicht mehr ausreichte. Der Abbauweg der Hydrazine muß sich deshalb nicht von dem in reinem Hämolysat unterscheiden.

Aus allen Versuchen läßt sich ableiten, daß bei der Oxydation von Hydrazinen ein Nebenweg beschritten wird, der zur Bildung eines oxydierenden Produktes führt. Der Anteil kann bis zu einem Prozent der eingesetzten Hydrazinmenge betragen. Hämoglobin wäre als Redoxindikator für diesen Weg aufzufassen und in vitro einzusetzen.

6. Zusammenfassung

Bei der Oxydation von Hydrazin, Dimethyl- und Diäthylhydrazin sowie dem Methylhydrazinderivat Natulan(R) wird im physiologischen pH-Bereich in vitro Hämoglobin zu Methämoglobin in langsamem Reaktionsverlauf oxydiert. Es wurde gezeigt, daß eine schnell oxydierende Substanz schon bei der Autoxydation wässriger Lösungen der Hydrazine entsteht. Ihre Bildung wird durch Oxyhämoglobin und durch Redoxstoffe, deren Potential im Bereich des Redoxpotentiales Oxyhämoglobin-Methämoglobin liegen, beschleunigt. Enzymatische Vorgänge scheinen dabei keine Rolle zu spielen. Die Entstehung der Substanz ist an die Anwesenheit von Sauerstoff gebunden und geht (mit Ausnahme von Natulan) mit der Abspaltung einer Alkylgruppe unter Oxydation zum entsprechenden Aldehyd einher. Die Bildung von Monoalkylhydrazinen konnte dünnschichtchromatographisch gesichert werden. Diese oxydieren Hämoglobin in schneller Reaktion, während sie bei Azoalkanen langsam verläuft. Daraus wird geschlossen, daß die Monoalkylhydrazine das Ausgangsprodukt für die oxydierenden Substanzen sind. Diese selbst konnten wegen ihrer Labilität nicht identifiziert werden. Zur Diskussion steht die Bildung eines Radikals oder - weniger wahrscheinlich - eines hydroxylaminähnlichen Stoffes. Sein Anteil an der eingesetzten Hydrazinmenge wird unter den angewendeten Bedingungen anhand des gebildeten Methämoglobins auf maximal 1 % geschätzt. Aussagen über seine biologische Bedeutung sind vorerst nicht möglich.

Literaturverzeichnis

1. Zitiert nach Houben Weyl: Methoden der org. Chemie, Band 10/2, 63 (1967)

2. Vielstich, W.: Untersuchungen über Reaktionsablauf und Elektrokatalyse in Zellen mit flüssigen Brennstoffen, Batelle Information 11, 56 (Juli 1971)

3. Colvin, L.B.: Metabolic Fate of Hydrazines and Hydrazides, Journal of Pharm. Sciences Vol. 58, Nr. 12 1433 (1969)

4. Zitiert nach Henschler, D. et al.: Gesundheitsschädliche Arzneistoffe, Hydrazin 1, MAK-Werte, Verlag Chemie (1972)

5. Fortney, S.R., D.A. Clark, E. Stein: Inhibition of Glucogenesis by Hydrazine Administration in Rats. J. of Pharmacol. exp. Ther. 156, 277 (1967)

6. Killam, K.F., J.A. Bain: Convulsant Hydrazides I: In vitro and in Vivo Inhibition of Vitamin B_6 Enzymes by Convulsant Hydrazides. J. of Pharmacol. exp. Ther. 119, 255 (1957)

7. McKennis, H., A.S. Yard, J.H. Weatherby, J.A. Hagy: Acetylation of Hydrazine and the Formation of 1,2-Diacetylhydrazine in Vivo. J. of Pharmacol. exp. Ther. 126, 109 (1959)

8. Biancifiori, C., R. Ribacchi: Pulmonary Tumors in Mice induced by Oral Isoniacid and its Metabolites, Nature 194, 488 (1962)

9. Druckrey, H., R. Preussmann, F. Matzkies, S. Ivanocovic: Selektive Erzeugung von Darmkrebs bei Ratten durch 1,2-Dimethylhydrazin. Naturwissenschaften 54, 285 (1967)

10. Zitiert nach (6).

11. Heubner, W.: Methämoglobinbildende Gifte. Ergebnisse der Physiologie 43, 9 (1940)

12. Kiese, M., H. Ühleke: Der Ort der N-Oxydation des Anilins im höheren Tier. Archiv f. exp. Path. u. Pharmakol. 242, 117 (1961).

13. Havemann, R., R.F. Jung, B. v.Jessekutz jun.:
Die Bestimmung von Methämoglobin im Blute mit dem lichtelektrischen Kolorimeter.
Biochem. Z. 301, 116 (1939)

14. Kiese, M.:
Empfindliche photometrische Verfahren zur Bestimmung von Hämiglobin und Hämoglobin.
Archiv f. exp. Path. u. Pharmakol. 204, 190 (1947)

15. Thauer, R.K., G. Stöffler, H. Ühleke: N-Hydroxylierung von Sulfonilamid zu p-Hydroxylaminobenzolsulfonamid durch Lebermikrosomen.
Archiv f. exp. Path. u. Pharmakol. 252, 32 (1965)

16. Zit.n.K.Winterfeld: Praktikum der org.präp. pharm. Chemie S. 322 (1960 Th. Steinkopff Verlag Dresden u. Leipzig)

17. MacFadyen, D.A.:
Estimation of Formaldehyd in Biological Mixtures.
J. of Biol. Chem. 158, 107 (1945)

18. Neurath, G., B. Pirmann, M. Dünger: Identifizierung von N-Nitroso-Verbindungen und asymmetrischen Hydrazinen als 5-Nitro-2-hydroxy-benzol-Derivate und Anwendung im Mikromaßstab
Chem. Ber. 97, 1631 (1964).

19. Kiese, M.:
Oxydation von Anilin zu Nitrosobenzol im Hunde.
Archiv f. exp. Path. u. Pharmakol. 235, 354 (1959)

20. Thiele, J.:
Isozyanate und Azoverbindungen der Fettreihe,IV Azoverbindungen.
Liebigs Annalen 376, 265 (1910).

21. Zitiert nach Weitzel, G., F. Schneider, W.-D. Hirschmann, J. Durst, R. Thauer, H. Ochs, D. Kummer: Untersuchungen zum cytostatischen Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine, III
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 443, (1967).

22. Zitiert nach Weitzel, G., F. Schneider, D. Kummer, H. Ochs: Cytostatischer Wirkungsmechanismus von Natulan.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 70, 354 (1968).

23. Bremner, J.M.:
Identification of Hydroxylamine and Hydrazine by Paper Chromatography.
Analyst 79, 198 (1954).

24. Bishop, Ch., Surgenor, D.M. et al.: The Red Blood Cell
Academic Press New York and London (1964)
S 397 ff.

25. Pollard, F.H., Nickless, G.: Quantitative Inorganic Chromatography Part VI Application to Kinetic Studies: The Oxydation of Hydrazine by Ferric Ion in Acid Aqueous Solutions.
J. Chromatogrphy 4, 196 (1960)

26. Wahler, B.E., Schofa, G., Thom, H.G.: Nachweis von Radikal-Zwischenstufen bei der Hämoglobinoxydation nach Einwirkung aromatischer Amine.
Archiv f. exp. Path. u. Pharmakol. 236, 20 (1959)

27. Zitiert nach Jocelyn, P.C.: Biochemistry of the SH-Group
Academic Press London and New York (1972)

28. Jung, F., Onnen, K.: Bindung und Wirkung des Formaldehyds an Erythrozyten.
Archiv f. exp. Path. u. Pharmakol. 224, 179 (1955)

Herrn Professor Dr. med. W. Schmid möchte ich für die Überlassung des Themas und die stets hilfreiche Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit danken.

L e b e n s l a u f

Am 26.10.1942 wurde ich als Sohn des Apothekers Walter Bouhon und seiner Ehefrau Annelies, geb. Mark, in Nürnberg geboren.
Die Grundschuljahre verbrachte ich von 1948 - 1953 an der Volksschule in Zirndorf. Von 1953 - 1955 besuchte ich das Neue Gymnasium in Nürnberg und wechselte dann auf den realgymnasialen Zweig der Privatschule Stahl über. 1956 trat ich in das private Knabeninstitut Kamber in Berg/Starnberg ein und blieb dort bis 1961. Nach einem Jahr Besuch der privaten Unterrichtskurse Paul Pfahler in Nürnberg ging ich in die Oberrealschule Fürth, wo ich 1964 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1964 - 1965 war ich als Praktikant in der Apotheke der Klinischen Universitäts-Anstalten in Erlangen tätig. Das zweite Praktikantenjahr absolvierte ich in der Mohren-Apotheke Nürnberg und legte im September 1966 mein Vorexamen ab.

Im Oktober 1966 begann ich das Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg, das ich am 15.10.1969 mit dem Staatsexamen abschloß. Vom November 1969 bis Mai 1970 arbeitete ich als Kandidat in der Mohren-Apotheke Nürnberg und dann bis Dezember 1970 in Marburg am Institut für Pharmazeutische Technologie. Im gleichen Monat begann ich mit der Dissertation am Pharmakologischen Institut. Meine Approbation als Apotheker erhielt ich am 14. April 1972.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:
Beier, Böhme, Braun, Cramer, Dimroth, Ebel, Führer, Haake, Hartke, Hensel, Heubel, Ihm, Kating, Karlson, Koransky, Krüpe, Kunz, List, Lehmann, Mahr, Neidlein , Nöth, Nürnberg, Nultsch, Otto, Petry, Pollmann, Portig, Schiff, Schmid, Schmitz, Siess, Stamm, Theile, Unterhalt, Vogel, Walcher, Wendt.